



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso 2018/2019

“OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE LÍPIDOS
POLARES ENRIQUECIDOS EN ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS A PARTIR DE MICROALGAS”

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Francisca Fernández García

Dirigido por: Luis Esteban Cerdán

Alfonso Robles Medina

Departamento de Ingeniería Química

1. ÍNDICE

2.	RESUMEN/ABSTRACT	3
3.	OBJETIVOS	4
4.	INTRODUCCIÓN	5
4.1	INTRODUCCIÓN A LOS LÍPIDOS.....	5
4.1.1	FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS	5
4.1.2	CLASIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS: SAPONIFICABLES E INSAPONIFICABLES. ÁCIDOS GRASOS	5
4.2	LÍPIDOS POLARES Y ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS. SALUD, BIODISPONIBILIDAD Y DIGESTIÓN.	6
4.2.1	ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3. IMPORTANCIA EN LA SALUD DEL SER HUMANO.	8
4.2.2	CONSUMO, BIODISPONIBILIDAD Y DIGESTIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	9
5.	MICROALGAS Y ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS.....	11
5.1	PERFIL DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS EN DISTINTAS ESPECIES DE LAS MICROALGAS.	12
5.2	CONCEPTO DE BIORREFINERÍA EN MICROALGAS	14
6.	MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES EN MICROALGAS	15
6.1	ROTURA CELULAR.....	15
6.1.1	HOMOGENIZACIÓN A ALTA PRESIÓN	18
6.2	EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES	18
6.2.1	EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES CON DISOLVENTES	19
6.2.2	NUEVAS TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES A PARTIR DE MICROALGAS	23
6.3	ENRIQUECIMIENTO DE LÍPIDOS POLARES CON ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS.	26
6.3.1	USO DE LIPASAS Y FOSFOLIPASAS EN METODOLOGÍAS ENZIMÁTICAS	28
6.3.2	DESARROLLO DE LOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS	31
6.4	PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL ACEITE OBTENIDO.....	36
7.	REFERENCIAS	37

2. RESUMEN/ABSTRACT

En los últimos años, se ha incrementado la producción y consumo de suplementos alimenticios ricos en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω -3 PUFA) tras el estudio realizado por Bang *et al.* (1976), donde demostraron que la baja incidencia de cardiopatías coronarias en los esquimales de Groenlandia era debido a una dieta rica en pescado (fuente principal de ω -3 en los últimos años). A partir de este momento, son incontables los artículos publicados sobre los beneficios del consumo de una cantidad óptima de este grupo de ácidos grasos poliinsaturados en la salud humana, considerados como ácidos grasos esenciales debido a que los mamíferos carecemos de ciertas desaturasas para sintetizarlos, provocando una tasa muy baja de conversión de ALA a DHA (primer paso en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados).

Tradicionalmente se ha consumido aceite de pescado como fuente principal de los PUFA necesarios en la dieta. Sin embargo, existen una serie de desventajas que han provocado el aumento de las investigaciones enfocadas a otras alternativas, destacando la producción y comercialización de los suplementos alimenticios ricos en ácidos grasos esenciales a partir de microalgas. Este nuevo método de producción ha demostrado ser una tecnología más económica, obteniendo mayores rendimientos y su producción a gran escala es sostenible con el medio ambiente, entre otras ventajas.

Además, la razón por la que se utilizan los lípidos polares (por ejemplo: los fosfolípidos) como fuente de ω -3 PUFA es su alta capacidad de transporte, además de que en algunas microalgas se ha demostrado que la mayoría de DHA se encuentra en los fosfolípidos, por lo que facilitaría la obtención de concentrados.

Como consecuencia, este trabajo ha tratado de seleccionar y detallar las estrategias realizadas en los últimos años para la producción de concentrados de lípidos polares ricos en PUFA a partir de microalgas, cuyo método, en general, posee los siguientes pasos:

- Rotura celular: previo un crecimiento preferiblemente heterotrófico, la homogenización a alta presión ha sido el método con mejores resultados.
- Extracción de lípidos polares: la utilización de disolventes orgánicos polares ha sido la alternativa ampliamente repetida por numerosos investigadores, aunque actualmente se buscan nuevos métodos respetuosos con el medio ambiente con los que se puedan obtener grandes rendimientos de extracción.
- Enriquecimiento de lípidos polares en ácidos grasos poliinsaturados: el uso de lipasas y fosfolipasas utilizados en los métodos enzimáticos ha sido la alternativa preferida frente a los métodos químicos.
- Purificación y obtención de concentrados: tras las estrategias de enriquecimiento se hace necesaria esta etapa para su uso comercial.

Palabras clave: microalgas, lípidos polares, PUFA.

ABSTRACT

In recent years, the production and consumption of food supplements rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) has increased following the study by Bang *et al.* (1976). In this article, they showed that the low incidence of coronary heart disease in Greenland Eskimos was due to a diet rich in fish (the main source of ω -3 PUFAs in recent years). From this time, there are countless articles published about the benefits of consuming an optimal amount of this group of polyunsaturated fatty acids in human health, considered as essential fatty acids because mammals lack certain desaturases to synthesize them, causing a very low conversion rate from ALA to DHA (first step in the biosynthesis route of polyunsaturated fatty acids).

Traditionally, fish oil has been consumed as the main source of the PUFAs. However, there are a number of disadvantages that have caused the increase in research focused on other alternatives, especially the production and commercialization of nutritional supplements rich in essential fatty acids from microalgae. This new production method has proven to be a more economical technology, obtaining higher yields and its large-scale production is sustainable with the environment, among other advantages.

Furthermore, the reason why polar lipids (for example: phospholipids) are used as a source of ω -3 PUFA is their high transport capacity, in addition to some microalgae it has been shown that the majority of DHA is found in phospholipids, so it would facilitate obtaining concentrates.

As a result, this work has tried to select and detail the strategies carried out in recent years for the production of polar lipid concentrates rich in PUFAs from microalgae, whose method, in general, has the following steps:

- Cell disruption: prior to preferably heterotrophic growth, High Pressure Homogenization has been the method with the best results.
- Polar lipid extraction: the use of polar organic solvents has been the alternative widely repeated by numerous researchers, although new eco-friendly methods are currently being sought.
- Enrichment of polar lipids in PUFA: lipases and phospholipases used in enzymatic methods has been the preferred alternative to chemical methods.
- Purification and obtaining of concentrates: after enrichment strategies, this step is necessary for commercial use.

Keywords: microalgae, polar lipid, PUFA.

3. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es justificar el por qué las recientes investigaciones y los artículos publicados de la producción de suplementos alimenticios ricos en ácidos grasos poliinsaturados se han enfocado en las microalgas y los lípidos polares, incluyendo los pros y contras de esta nueva alternativa sobre la salud humana y el medio ambiente.

Posteriormente se seleccionarán, tras una profunda investigación bibliográfica, a aquellos métodos que mayoritariamente han sido seguidos por los distintos autores citados, mencionando los rendimientos obtenidos por cada uno de ellos y sus condiciones de operación.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 INTRODUCCIÓN A LOS LÍPIDOS

Existen cuatro principales grupos de compuestos en la materia viva: ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, siendo este último grupo el objeto de esta revisión bibliográfica.

Distintos autores aportan distintas definiciones a los lípidos, pero de forma general se puede considerar a los lípidos como *“sustancias de origen natural que son solubles en solventes orgánicos, excluyendo a los compuestos producidos por síntesis”* (Rodríguez, 2008).

Según la definición química, *“los lípidos son moléculas hidrófobas que pueden originarse completamente o en parte a través de condensaciones de tioésteres o unidades de isopreno”* (Hoyos Serrano y Rosales Calle, 2014).

Cabe destacar que los lípidos forman un grupo químicamente diverso de compuestos que presentan dos características en común (Rodríguez, 2008):

- Presentan insolubilidad en medio acuoso
- Solubles en disolventes orgánicos no polares

4.1.1 FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS

Las funciones biológicas que cumplen los lípidos también se caracterizan por su gran diversidad, haciéndolos necesarios en la nutrición humana.

En numerosos seres vivos, las grasas y los aceites poseen el papel de la forma principal de almacenamiento de energía, mientras que los fosfolípidos y los esteroides se caracterizan por constituir los principales elementos de la estructura de las membranas biológicas formando las bicapas lipídicas. Por otro lado, algunos se comportan como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos y pigmentos que absorben la luz visible. Estos últimos lípidos son moléculas de pigmentos con un sistema de dobles enlaces conjugados, los cuales actúan como captadores de luz en la visión y en la fotosíntesis (Nelson y Cox, 2006).

Por último, algunos lípidos podrían actuar como chaperonas para facilitar el plegamiento de las proteínas, emulsionantes en el tracto digestivo, hormonas y mensajeros intracelulares (Nelson y Cox, 2006).

4.1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS: SAPONIFICABLES E INSAPONIFICABLES. ÁCIDOS GRASOS

Existen en bibliografía numerosas formas de clasificación de los lípidos, siendo una de ellas en función de la presencia o no de ácidos grasos en su estructura molecular. En este caso, podemos dividir la clasificación como lípidos saponificables y los insaponificables. La mayor diferencia entre ambos es que los primeros poseen ácidos grasos en su estructura, mientras que los insaponificables carecen de ellos (Nelson y Cox, 2006).

Los ácidos grasos (Fig. 1) son ácidos orgánicos monocarboxílicos que se encuentran formando parte de los triglicéridos o como ácidos grasos “libres”. Su estructura se basa en una cadena hidrocarbonada y anfipática terminada en un grupo metilo. En la naturaleza y por motivos de su biosíntesis, los organismos superiores únicamente poseen ácidos grasos con un número par de átomos de carbono en su estructura (Argüeso Armesto et al., 2011).

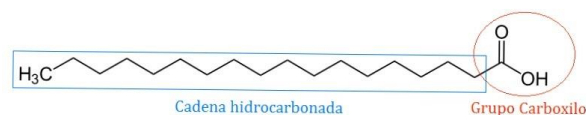


Figura 1: Estructura molecular de un ácido graso. Formado por una cadena hidrocarbonada de un número variable de carbonos y un grupo carboxilo terminal.

Los ácidos grasos se pueden dividir en dos grupos en función de la presencia o no de dobles enlaces en su cadena. Por ello, conoceremos como ácidos grasos saturados a aquellos que no poseen dobles enlaces, mientras que los insaturados serán aquellos que sí los posean. Dentro de los insaturados nos encontraremos a los monoinsaturados cuando únicamente posean un doble enlace, mientras que los poliinsaturados son aquellos que poseen dos o más dobles enlaces (Argüeso Armesto *et al.*, 2011), los cuales son de interés en esta revisión.

Los ácidos grasos poliinsaturados (Fig. 2) son, por tanto, aquellos ácidos grasos que poseen dos o más dobles enlaces en su estructura. Sus dobles enlaces suelen encontrarse entre los carbonos doce y trece y el quince y dieciséis. Estos dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en alternancia con enlaces sencillos, es decir, están separados por grupos metileno (Nelson y Cox, 2006).

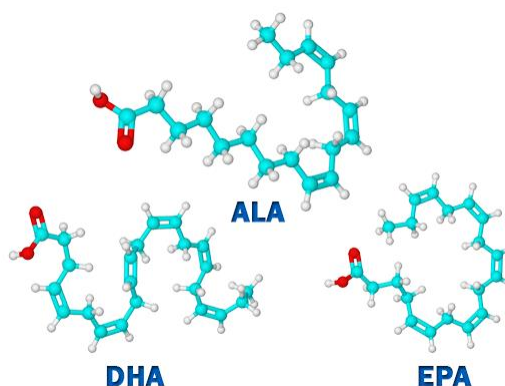


Figura 2: Tres ejemplos de estructuras de ácidos grasos poliinsaturados pertenecientes al grupo omega-3. Todos ellos presentan más de un doble enlace en su cadena hidrocarbonada.

4.2 LÍPIDOS POLARES Y ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS. SALUD, BIODISPONIBILIDAD Y DIGESTIÓN.

Los lípidos polares son aquellos que poseen grupos polares o con carga, como los fosfolípidos y los glucolípidos. La característica más importante y que une a todos ellos es su naturaleza anfipática, por la cual su estructura posee una región polar y otra no polar (Rodríguez, 2008). En la figura tres se muestra un ejemplo de estructura de un lípido polar.

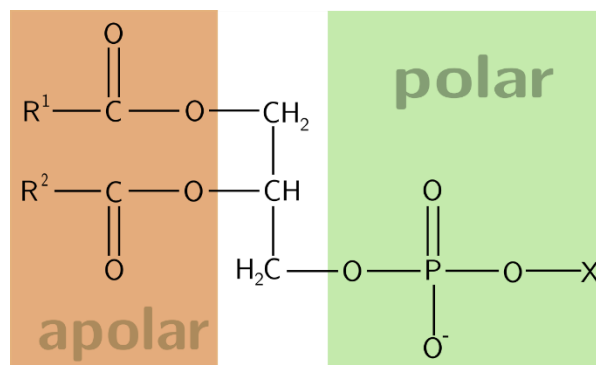


Figura 3: Ejemplo de lípido polar. Estructura molecular de un fosfolípido, la cual posee naturaleza anfipática: una región polar y otra apolar o no polar.

La importancia de la extracción de los lípidos polares a partir de microalgas radica en el conocimiento de que, durante el crecimiento de la microalga, la mayoría de los ácidos grasos que se producen forman parte de diacilgliceroles polares, incluyendo diferentes clases de glucolípidos, fosfolípidos, etcétera (Rodríguez, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que los glucolípidos en las microalgas están compuestos predominantemente por acilos grasos de dieciséis y dieciocho átomos de carbono, grupos que a menudo son poliinsaturados (PUFA), entre los que destacan los ácidos grasos omega-3 (ω -3 PUFA) y el ácido α -linoleico. Estos están localizados en las membranas de los tilacoides y cloroplastos, donde juegan su papel principal en la fotosíntesis, señalización y regulación celular (White *et al.*, 2019).

Sin embargo, la composición de ácidos grasos, la longitud de sus cadenas y el grado de insaturación de los lípidos procedentes de microalgas varían en función de las condiciones de crecimiento de estas, incluyendo la limitación por nutriente, dando lugar a la posibilidad de variación en el número y la combinación de especies moleculares contenidas dentro de cada clase de lípidos polares. Por lo tanto, los métodos encontrados en bibliografía para obtener concentrados de lípidos polares enriquecidos en PUFA a menudo comienzan con una evaluación de los lípidos polares en distintas especies de microalgas para entender la respuesta lipídica y su posterior metabolismo cuando estas son expuestas a diferentes condiciones, con el objetivo de conseguir mejores resultados (White *et al.*, 2019).

Desde que gran cantidad de artículos sugiriesen que los lípidos polares extraídos a partir de microalgas poseen un significativo potencial biotecnológico, y que esta actividad de sus compuestos está influenciada por su estructura química, las investigaciones buscan comprender los efectos de las condiciones de crecimiento en el rendimiento y naturaleza química de estos compuestos y las especies que lo contienen con una visión comercial hacia la invención de un sistema de producción de lípidos polares a partir de microalgas rentable (Plouguerné *et al.*, 2014).

Es de interés citar en esta revisión bibliográfica que estudios recientes han demostrado que una porción significativa de PUFA de la línea tres están asociados con lípidos polares. Esta asociación podría incrementar la absorción de los PUFA omega-3 por parte del estómago, una vez tomado como suplemento alimenticio, y proporcionar una mayor estabilidad oxidativa con respecto a los aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados comercializados durante los últimos años (Servaes *et al.*, 2015).

4.2.1 ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3. IMPORTANCIA EN LA SALUD DEL SER HUMANO.

Los ácidos grasos se han clasificado según la posición de su último doble enlace en relación con el último átomo de carbono de su estructura, al que se llama omega, ω . Por ello, los ácidos grasos poliinsaturados se pueden clasificar en omega-3 (ω -3), omega-6 (ω -6), omega-7 (ω -7) y omega-9 (ω -9).

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω -3 PUFA) son considerados como ácidos grasos esenciales porque los seres humanos no podemos sintetizarlos *de novo* debido a que los mamíferos carecemos de las enzimas Δ -12 y Δ -15 desaturasas, por lo que deben ser añadidos en la dieta (Nguyen *et al.*, 2019). Estas desaturasas añaden dobles enlaces en las posiciones ω -3 y ω -6 y por ello, el hombre debe incorporar sus precursores mediante la alimentación como ácidos grasos esenciales (Argüeso Armesto *et al.*, 2011).

Los artículos que relatan los métodos de enriquecimiento de lípidos polares con PUFA se centran, en su mayoría, en los PUFA pertenecientes al grupo ω -3, ya que son los más demandados por el mercado. Los ω -3 PUFA son ácidos grasos con veinte o más átomos de carbono en su estructura, productos de la elongación y desaturación del ácido α -linolénico (ALA, C18:3 n-3). Dentro de este grupo destacan el ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5n-3), el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3).

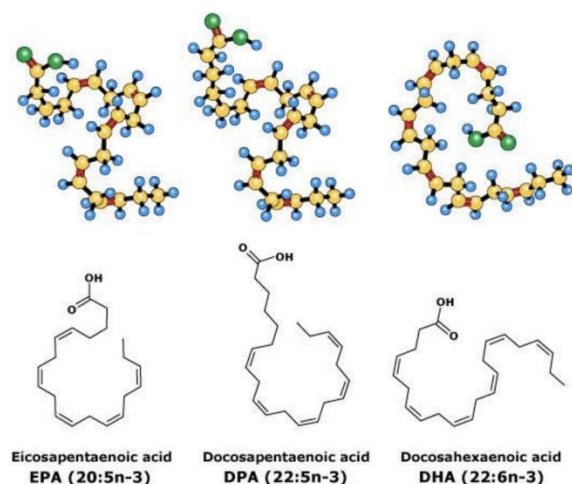


Figura 4: Estructura molecular de EPA, DPA y DHA.

Aunque se ha demostrado una gran cantidad de beneficios en la salud humana del DPA (Hino *et al.*, 2004), la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha confirman que el EPA y el DHA son los PUFA que mayores beneficios aportan a la salud del ser humano, algunos de ellos mencionados a continuación.

Los ω -3 PUFA, en general, han sido objeto de estudio de numerosas investigaciones científicas publicadas en numerosos artículos por diferentes revistas desde que Bang, Dyerberg y Hjorae demostrasen, en 1976, la relación entre la baja incidencia de cardiopatías coronarias en los esquimales de Groenlandia y su alto nivel de consumo de pescado (principal fuente de omega-3 en los últimos años) (Bang *et al.*, 1976). En resumen, estas investigaciones han llegado a la conclusión de que los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω -3 PUFA) tienen importancia en el desarrollo neurológico durante el embarazo y la lactancia, en la salud cardiovascular y, además, cabe destacar la existencia de un auge en los últimos años en las investigaciones que relacionan la influencia de estos ácidos grasos poliinsaturados en la salud mental.

Se han sugerido la existencia de diversos mecanismos por los cuales los ω -3 PUFA facilitan los beneficios citados anteriormente (De Groot et al., 2019):

- Importancia del papel estructural en la membrana de la célula que influye en la transducción de señales.
- Estimulación del crecimiento neuronal e intervención en la acción del neurotransmisor.
- Capacidad de liberar y facilitar la captación de glucosa de las células endoteliales en el cerebro.

Por otra parte, estos ácidos grasos poliinsaturados son precursores importantes de los eicosanoides, provocando una disminución de la coagulación de la sangre y, por tanto, un aumento del flujo sanguíneo. Además, DHA es precursor de ciertos docosanoides que producen efectos antiinflamatorios y de ciertas neuroprotectinas que protegen a las neuronas (Parletta et al., 2013).

Por último, J.P Jacob et al. (2016) puntualizaron la necesidad de consumo de DHA en los recién nacidos para conseguir un óptimo desarrollo cognitivo, hecho demostrado por el resultado de que los bebés alimentados con leche procedente del pecho, que naturalmente contiene DHA, han rendido mejor en las pruebas que evalúan el desarrollo neurológico comparado con los bebés alimentados con leche que carece de este ácido graso poliinsaturado (Jacob y Mathew, 2016).

Tras lo citado anteriormente es fácil de comprender el aumento de los últimos años en la producción y venta en el mercado de los suplementos alimenticios de ω -3 PUFA. Por ello, todo esto se traduce en un incremento de la búsqueda de estrategias para incrementar su consumo y abaratar los costes de producción y extracción (Leal Medina et al., 2017). De todas estas estrategias han sido seleccionadas en este trabajo, con el objetivo de ser detalladas en los distintos apartados, aquellas que mejores resultados y rendimiento han obtenido y, como en consecuencia, las más reproducidas por distintos investigadores.

4.2.2 CONSUMO, BIODISPONIBILIDAD Y DIGESTIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

El consumo diario de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente los ácidos grasos de la serie tres, es ampliamente recomendado en numerosos países debido a sus únicos beneficios en la salud humana y sus propiedades farmacéuticas. Las recomendaciones del consumo diario de ω -3 PUFA depende de distintos factores como la edad, sexo y el propósito por el que se ingieren (Nguyen et al., 2019).

Tabla 1: Recomendaciones por parte de la 'National Health and Medical Research Council (NHMRC)' para el consumo diario de ALA y de EPA+DPA+DHA.

	HOMBRE	MUJER
ALA	1,3 g/día	0,8 g/día
EPA+DPA+DHA	160 mg/día	90 mg/día

Estos valores no se consideran óptimos, pero sí suficientes para prevenir los síntomas por deficiencia de ω -3 PUFA en adultos.

Tabla 2: Recomendaciones de consumo total diario de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de la NHMRC para prevenir el riesgo de contraer una enfermedad crónica.

	HOMBRE	MUJER
ω -3 PUFA TOTALES	610 mg/día	430 mg/día

Tabla 3: Recomendaciones por parte de la ‘Organización de las Naciones Unidas (FAO)’ y la ‘World Health Organization (WHO)’ como consumo de EPA+DHA para prevenir enfermedades coronarias.

	HOMBRES Y MUJERES ADULTOS	MUJERES EMBARAZADAS Y/O LACTANTES	PACIENTES ENFERMOS
EPA+DHA	250 mg/día	300 mg/día	2-4 g/día

Para las mujeres en situación de embarazo o lactancia recomiendan un consumo mayor. La ‘American Heart Association’ recomienda el máximo consumo para pacientes enfermos en tratamiento para ciertas enfermedades como la hipertrigliceridemia.

A pesar de estas recomendaciones, el suministro de ω -3 PUFA en el ser humano depende, no solo de la cantidad de la respectiva sustancia en el alimento, sino también en la biodisponibilidad. La biodisponibilidad es la medida en la que un nutriente puede ser absorbido y transportado al sistema circulatorio o a la actividad fisiológica (Servaes *et al.*, 2015), y está determinada por numerosos factores, los cuales han sido investigados en función de los resultados de sus efectos en diferentes ensayos *in vitro*, llegando a conclusiones que merecen ser mencionadas en esta revisión.

Andreas Hahn y Jan Philipp Schuchardt (2013), en su artículo llamado “*Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids*”, afirmaron que la biodisponibilidad de los ácidos grasos de interés estudiados se ven influenciados por tres factores principales:

- 1) Forma del enlace químico entre ácidos grasos: los ácidos grasos libres se unen en ésteres, triacilglicéridos o fosfolípidos.
- 2) Efectos de la matriz: cápsula para ingerir con los alimentos, contenido de grasa en los alimentos.
- 3) Forma galénica o forma farmacéutica: adaptación entre el principio activo y el excipiente de un medicamento. Por ejemplo, la microencapsulación y la emulsificación.

A estos tres factores principales se le podría añadir otros como las propiedades físico-químicas, ausencia o presencia de otros ingredientes en el alimento que podría mejorar o inhibir la absorción, su posterior metabolización, estado de salud del consumidor, etcétera. Por ejemplo, los iones de calcio pueden formar un complejo con el ácido graso y reducir su biodisponibilidad.

En el ser humano existen dos rutas de biosíntesis reconocidas para los ω -3 PUFA: la ruta actualmente aceptada y la ruta metabólica convencional (Fig. 5). En la primera, se produce DHA a partir de DPA mediante desaturación y elongaciones secuenciales donde finalmente ocurre una oxidación β que acorta el ácido tetracosapentaenoico (24:5n-3) dos carbonos. La última vía metabólica convencional, por el contrario, consiste en la conversión directa de DHA a partir de DPA catalizado por la enzima Δ -4 desaturasa (Nguyen *et al.*, 2019).

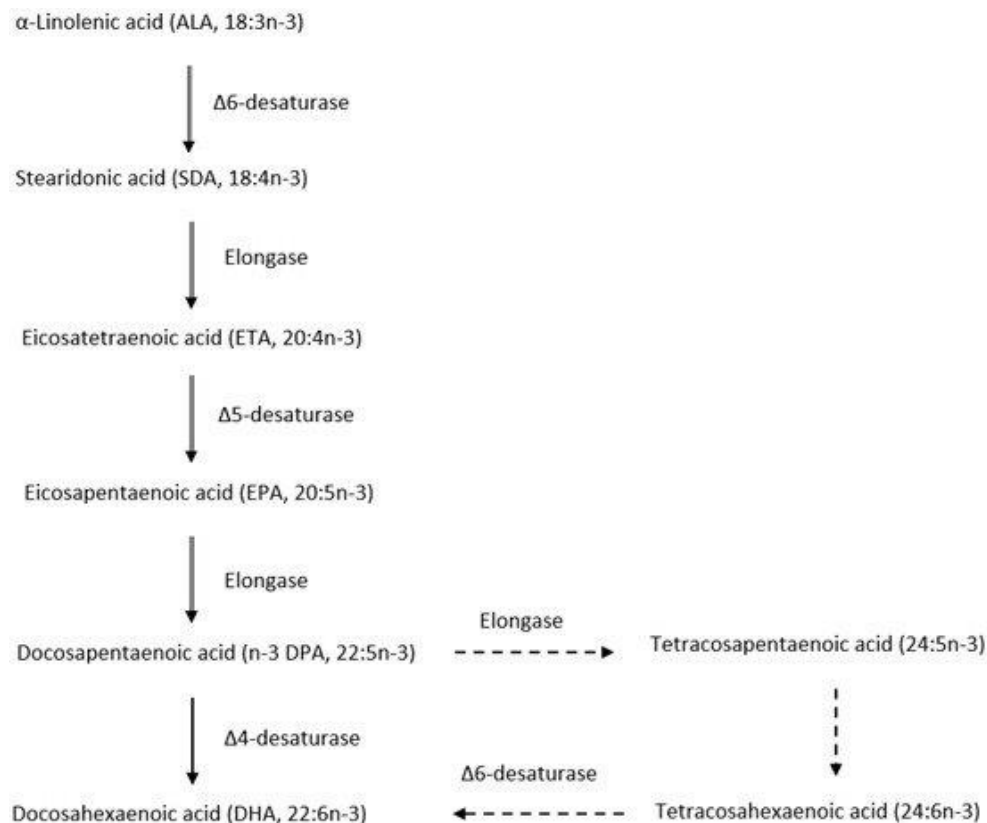


Figura 5: posible biosíntesis y vía metabólica de los ω -3 PUFA. Las flechas gruesas representan la vía convencional; las líneas discontinuas representan la ruta actualmente aceptada. Fuente: Nguyen et al. (2019)

Aunque estas rutas metabólicas han sido demostradas, es necesario la existencia de mayor número de investigaciones para aclarar la vía específica para la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en el cuerpo humano, aunque algunos estudios han confirmado una tasa muy baja de conversión de ALA a DHA (0,05% o menos), por lo que se confirmaría que la mejor forma de adquirir los ácidos grasos esenciales es a través de fuentes nutricionales ricas en ellos (Nguyen et al., 2019).

5. MICROALGAS Y ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

En la actualidad, la principal fuente de PUFA es el aceite de pescado. Sin embargo, se ha ido asociando numerosas desventajas a la utilización de pescados para la extracción de PUFA con objeto de suplemento alimenticio: el fuerte y desagradable olor, posibilidad de contaminación del pescado con metales pesados, existencia de altos niveles de colesterol y problemas en el momento de la purificación de estos PUFA por una composición variable de ácidos grasos (Leal Medina et al., 2017).

Además, con el agotamiento de las poblaciones de peces, en un futuro sería muy difícil satisfacer la demanda de consumo de omega-3 con únicamente aceite de pescado (Servaes et al., 2015).

Por otro lado, se conoce que los peces obtienen los ácidos grasos poliinsaturados del Zooplancton, el cual se alimenta de algas (Wen y Chen, 2000). Este hecho, junto a las desventajas citadas, ha provocado que el nuevo enfoque en la producción de ácidos grasos poliinsaturados esté centrado en las microalgas, ya que son una fuente abundante de omega-3 y podría convertirse en una alternativa al aceite de pescado.

Las microalgas son organismos unicelulares que forman un grupo muy variado en sus características (por ejemplo, protistas eucarióticos y cianobacterias procariotas) con gran capacidad de crecimiento rápido y estructura simple (Sforza et al., 2010). Es de nuestro interés que las microalgas posean en la estructura de sus células como uno de los componentes principales los lípidos y, por tanto, la fracción lipídica rica en PUFA es mayor respecto a los peces. Los lípidos participan en ellas en numerosas funciones celulares, incluyendo el almacenamiento de energía, estructura e integridad de la membrana celular, fotosíntesis, metabolismo y señalización entre células (White et al., 2019).

Se ha podido comprobar en bibliografía que, en los últimos años, se ha disparado el número de estudios e investigaciones con el objeto de optimizar y rentabilizar el uso de microalgas como fuente de ácidos grasos poliinsaturados. En definitiva, la producción de aceite enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados a partir de seres vivos unicelulares es considerablemente nuevo, siendo las microalgas una opción destacable debido a ser una fuente más económica que lo conocido hasta el momento (White et al., 2019).

La producción de ácidos grasos poliinsaturados con tecnología de microalgas ha demostrado estar más avanzada que las rutas convencionales de extracción a partir de aceite de pescado porque la microalga, aparte de producir grandes rendimientos de PUFA, puede ser fácilmente cultivada con grandes producciones de biomasa y aceite. Además, comparado con el aceite de pescado, la producción a gran escala es sostenible con el medio ambiente y puede ser utilizado por la comunidad vegana (Wang et al., 2015).

Los procesos existentes de obtención de concentrados de lípidos polares enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados a partir de microalgas serán redactados en esta revisión bibliográfica a continuación, seleccionando los métodos más destacables que han sido publicados, para poner a disposición del lector los diferentes procedimientos realizados hasta la fecha.

5.1 PERFIL DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS EN DISTINTAS ESPECIES DE LAS MICROALGAS

El contenido de lípidos en la biomasa de las microalgas es variable según la familia y especie, además de las condiciones de crecimiento al que sean sometidas. De hecho, numerosos estudios han demostrado que el contenido de lípidos de las microalgas depende de los distintos factores de los cultivos en los que se crecen (Tabla 4), afectando a la producción de ácidos grasos y al contenido total en las microalgas (Leal Medina et al., 2017):

Tabla 4: Miligramos de lípidos por gramo de biomasa seca en distintas especies de microalgas tras un crecimiento en un medio sin nitrógeno las tres primeras, mientras que las dos últimas crecieron en un medio con nitrógeno.

MICROALGA	MILIGRAMOS DE LÍPIDOS POR GRAMO DE BIOMASA SECA
<i>Ankistrodesmus sp</i>	263,6
<i>Ankistrodesmus nannoselene</i>	316
<i>Scenedesmus sp</i>	243,3
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	159,1
<i>Chlorella sp</i>	221,1

Por otro lado, la cantidad y el perfil de ácidos grasos de las microalgas se considera como característico de la especie y no del género, por lo que podemos observar una gran variación entre especies de un mismo grupo taxonómico (Montero et al., 2012). Además, la composición lipídica que se obtiene de distintas especies de microalgas está afectada tanto por las condiciones de cultivo como el método de extracción usado (Servaes et al., 2015). Por ejemplo, aquellas microalgas recolectadas en la fase de crecimiento exponencial, cuando la producción

está en modo continuo, tendrán más lípidos polares que las recolectadas en la fase estacionaria (Molina Grima et al., 2012).

Es bien conocido que el crecimiento de las microalgas puede ser autotrófico o heterotrófico, siendo esta última la que ha sido señalada como la alternativa más económica en la producción de lípidos polares enriquecidos en PUFA ya que el crecimiento autotrófico tiene la desventaja de la limitación de crecimiento por luz (Sforza et al., 2010). Además, Pérez García et al. (2011) demostraron que las diatomeas *Tetraselmis spp.*, *N. laevis* y *N. alba* producen una mayor cantidad de EPA y DHA en condiciones de oscuridad, concluyeron que las condiciones de crecimiento heterotróficas pueden producir el doble o incluso el triple de ω -3 PUFA con respecto a los obtenidos en condiciones autotróficas.

Yao et al. (2015), en su artículo llamado “*Microalgae Lipid Characterization*”, caracterizaron los lípidos en algunas especies de microalgas (Tabla 5) señalando la necesidad de llevarlo a cabo debido al creciente interés del uso de estas en la producción de biocombustibles, además de otras industrias. Los datos publicados son:

Tabla 5: Composición de lípidos de diferentes microalgas en porcentaje en peso. Los valores en paréntesis son las desviaciones estándar que obtuvieron al realizar tres repeticiones para calcular los triacilgliceroles y los ácidos grasos libres, mientras que para los lípidos polares y los insaponificables realizaron dos repeticiones. Fuente: (Yao et al., 2015)

	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Scenedesmus sp</i>	<i>Schizochytrium limacinum</i>
Lípidos neutros	51,3	57,2	14,5	31,5	78,2
Triacilgliceroles	24,5 (2,2)	26,6 (2,8)	8,6 (1,5)	4,1 (0,8)	77,5 (6,4)
Ácidos grasos libres	26,8 (2,3)	30,6 (2,1)	5,9 (0,6)	27,4 (1,3)	0,7 (0,6)
Lípidos polares	9,7 (0,3)	0,7 (0,0)	24,6 (0,4)	0,7 (0,1)	0,9 (0,2)
Lípidos insaponificables	13,1 (0,1)	13,2 (0,4)	14,6 (0,4)	18,7 (0,6)	1,9 (0,0)
Clorofila	16,8	14,6	5,8	14,3	-
Otras	9,1	14,3	40,5	34,8	19,1

Tabla 6: Composición de ácidos grasos en peso con respecto al contenido de lípidos totales mostrado en la tabla 5. Fuente: (Yao et al., 2015)

Ácidos grasos	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Scenedesmus sp</i>	<i>Schizochytrium limacinum</i>
Saturados (SFA)	33,6	23,2	27,5	37,2	68,1
Monosaturados (MUFA)	24,8	14,9	30,0	16,3	0,1
Poliinsaturados (PUFA)	41,6	61,9	42,5	46,5	31,8

De los resultados reflejados en las tablas podemos concluir que la especie estudiada por este grupo de investigadores de mayor interés para nuestro objetivo sería *C. reinhardtii* ya que, aunque no tenga el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, es una especie rica en lípidos polares.

Previamente a este artículo, Bellou et al. (2014) recopilaron el perfil de ácidos grasos de microalgas expuestos en bibliografía por diferentes autores. Tras hacer una recopilación de las especies con mayor porcentaje de PUFA en su biomasa, obtenemos la siguiente tabla en la que referenciamos a aquellas microalgas ricas en ALA, EPA y DHA:

Tabla 7: Información recopilada y tabla editada de Bellou et al. (2014). Porcentaje de ALA, EPA y DHA en las microalgas más ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 según los datos publicados de diferentes autores. En algunas especies no se han encontrado datos del porcentaje de algún ω -3 PUFA.

MICROALGA	ALA	EPA	DHA
<i>Chlamydomonas</i> sp.	29,0	19,2	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	48,2	5,4	-
<i>Chroomonas salina</i>	10,8	12,9	7,1
<i>Prorocentrum</i> sp.	2,3	3,7	20,1
<i>Isochrysis</i> sp.	6,3	0,9	15,0
<i>Pavlova</i> sp.	2,4	28,9	7,2
<i>Asterionella</i> sp.	1,1	26,4	8,9
<i>Nannochloropsis</i> sp.	0,1	33,0	0,6
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0,9	30,0	3,1
<i>Schizochytrium</i> sp.	-	-	57,6
<i>Porphyridium cruentum</i>	-	37,5	-

5.2 CONCEPTO DE BIORREFINERÍA EN MICROALGAS

El concepto de biorrefinería en microalgas comenzó a cobrar importancia tras el descubrimiento de la posibilidad de producir biodiésel a partir de ellas con el objetivo de sustituir a los combustibles fósiles, debido a que ningún autor ha publicado aún un método que sea económica y energéticamente factible. Por ello, la biorrefinería en microalgas busca una valorización completa de cada componente de estas con el objetivo de sacar mayor rendimiento económico (Roux et al., 2017).

El proceso de biorrefinería basada en microalgas ha atraído la atención de numerosos investigadores debido al valor añadido de numerosos constituyentes de sus células, entre los que se encuentran lípidos (7-23%), proteínas (6-52%) y carbohidratos (5-23%) que podrían ser utilizados para la producción de biocombustible, alimento, etcétera (Lee et al., 2017). El enfoque sobre las microalgas es debido a que son los seres vivos con mayor eficiencia fotosintética conocida hasta la actualidad y numerosos artículos sugieren la posibilidad de crear una fuente de combustible alternativa usando la energía solar, el dióxido de carbono y la biomasa (Milano et al., 2016).

En esta revisión bibliográfica nos interesan los artículos publicados por autores en los que estudian diferentes lípidos polares ricos en ácidos grasos poliinsaturados de valor añadido presentes en las microalgas. Las microalgas producen triacilglicéridos que se pueden convertir en biodiesel, pero también se puede utilizar las microalgas como fuente de suplementos alimenticios, ya citado con anterioridad, como el omega-3.

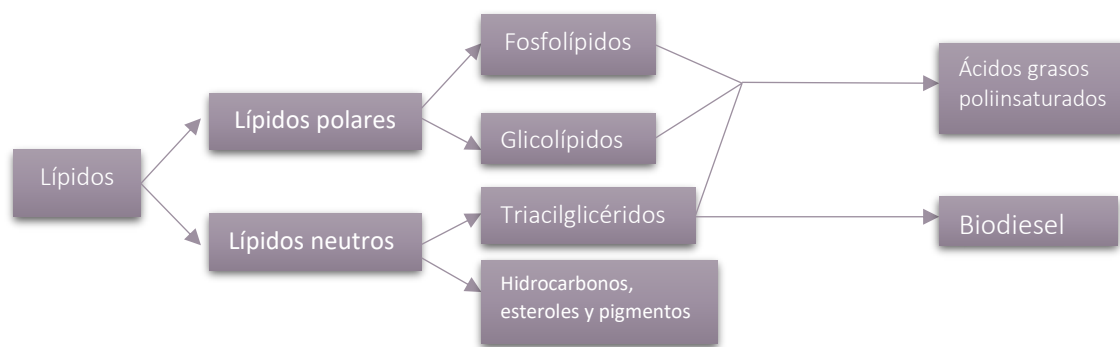


Figura 6: Biorrefinería de lípidos en microalgas. Los fosfolípidos, glicolípidos y triacilglicéridos obtenidos de la biomasa microalgal pueden ser aprovechados por la industria alimentaria para la producción y venta de ácidos grasos poliinsaturados como omega-3, mientras que los triacilglicéridos también pueden ser utilizados para la fabricación de biodiesel. Editada y traducida de Milano et al. (2016).

En conclusión, la industria interesada en la extracción de lípidos polares enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados a partir de microalgas podría buscar otros productos de valor añadido con el objeto de obtener un mayor rendimiento económico. Esto es debido a que los lípidos no son los únicos componentes de valor de las microalgas, sino que también producen una serie de pigmentos, vitaminas, proteínas, enzimas y antibióticos que podrían formar parte de una biorrefinería.

Para llevar a cabo un proceso de biorrefinería a gran escala energéticamente factible hay que seleccionar un método de rotura celular y posterior extracción de lípidos eficiente, siendo necesario como primer paso el conocimiento de la composición de la pared celular de la microalga utilizada.

6. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES EN MICROALGAS

La extracción de lípidos polares en microalgas se dividirá y desarrollará en diferentes pasos:

- Rotura celular de la microalga.
- Extracción de lípidos polares.
- Enriquecimiento de los lípidos polares en ácidos grasos poliinsaturados.
- Purificación y obtención de concentrados de lípidos polares enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados.

6.1 ROTURA CELULAR

Las microalgas son organismos unicelulares eucarióticos que poseen una membrana plasmática protegida por una pared celular (Arnold et al., 2015). Los componentes, los enlaces intermoleculares y la estructura de las paredes celulares de las microalgas varían entre especies, además de las condiciones de crecimiento y de la existencia de factores de estrés (Work et al., 2013).

Tabla 8: Estructura, composición y aplicaciones industriales de la pared celular de las microalgas *C. reinhardtii*, *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis sp.* Estas microalgas son de interés porque han sido señaladas anteriormente en esta revisión como ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Adaptado de Work et al., 2013.

MICROALGA	ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	APLICACIONES Y PRODUCTOS
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<p>Cinco distintas capas de glicoproteínas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vaina externa trilaminar o capa microfibrilar. ▪ Sin celulosa. ▪ Ensamblada completamente de glicoproteínas. 	Organismo modelo para el ciclo celular y los estudios de genética molecular.
<i>Chlorella sp.</i>	<p>Pared celular con bicapa:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La capa exterior posee una estructura laminar, densa en electrones y delgada capa de algaenan. ▪ La capa interna posee una baja densidad y está compuesta de manosa y polisacárido tipo quitina. 	Lípidos, nutrición humana, cosmética y alimento en acuicultura.
<i>Nannochloropsis sp.</i>	<p>Estructura que consiste en una bicapa: pared interna celulósica protegida por una capa externa de algaeno hidrófoba.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Capa externa: alto grado de saturación y alifática de cadena larga con enlaces éter cruzados. ▪ Capa interna: vaina trilaminar a base de celulosa. 	Lípidos y alimento en acuicultura.

A pesar de esta diversidad, los componentes mayoritarios de las paredes celulares de las microalgas son los lípidos, celulosas, proteínas, glicoproteínas y polisacáridos. Además de estos componentes fundamentales, la pared celular incluye una red microfibrilar dentro de una matriz de proteínas tipo gel, e incluso algunas microalgas están protegidas por una pared rígida inorgánica compuesta de sílice o carbonato de calcio (Lee et al., 2017).

Todas las características citadas de la pared celular de las microalgas provocan que, para acceder a los lípidos polares que no se excretan al medio, sea necesario llevar a cabo una rotura celular con pretratamientos previos utilizando diferentes metodologías (altas presiones, temperaturas y/o ácidos fuertes, ...) para separar la biomasa de microalgas. En bibliografía se encuentran numerosos métodos por los que investigadores de todo el mundo han llevado a cabo esta rotura hasta la fecha.

Esta revisión se centrará en nombrar las etapas de extracción de lípidos polares en las microalgas, las cuales incluyen la rotura de su pared celular por métodos físico-químicos y biológicos, además de su posterior recolección mediante el uso de disolventes polares (Lee et al., 2017). Hay que tener en cuenta que algunas paredes celulares fuertes, resistentes a estreses mecánicos y químicos, inhiben los disolventes orgánicos utilizados por los métodos más tradicionales, como el hexano, lo que disminuye el éxito de esta extracción (Kim et al., 2016).

Por lo tanto, un conocimiento de la fisiología y de la estructura de la pared celular de la microalga utilizada para la producción de lípidos es necesario con el fin de predecir el costo y la eficiencia energética del proceso de rotura y extracción. Lee et al. (2017) realizaron una revisión exhaustiva de las investigaciones realizadas hasta la fecha de la estructura de la pared celular y los métodos de extracción de microalgas. En ella, afirman que la naturaleza química y la composición de la pared celular tendrán importancia en las aplicaciones biotecnológicas de los productos intracelulares, además de informar de la eficiencia de los pretratamientos previos a la rotura celular.

Son numerosos los métodos utilizados para la rotura celular y la extracción de componentes intracelulares en microalgas. Roux et al. (2017) clasifican estos métodos como mecánicos y no mecánicos. En la figura 7 se recogen diversos de rotura celular empleados hasta la fecha, tales como la molienda de bolas, homogenización a alta presión, métodos de cavitación como el

tratamiento con ultrasonidos, uso de microondas, pulsos eléctricos, métodos químicos como uso de disolventes, líquidos iónicos, hidrólisis enzimática, entre otros.

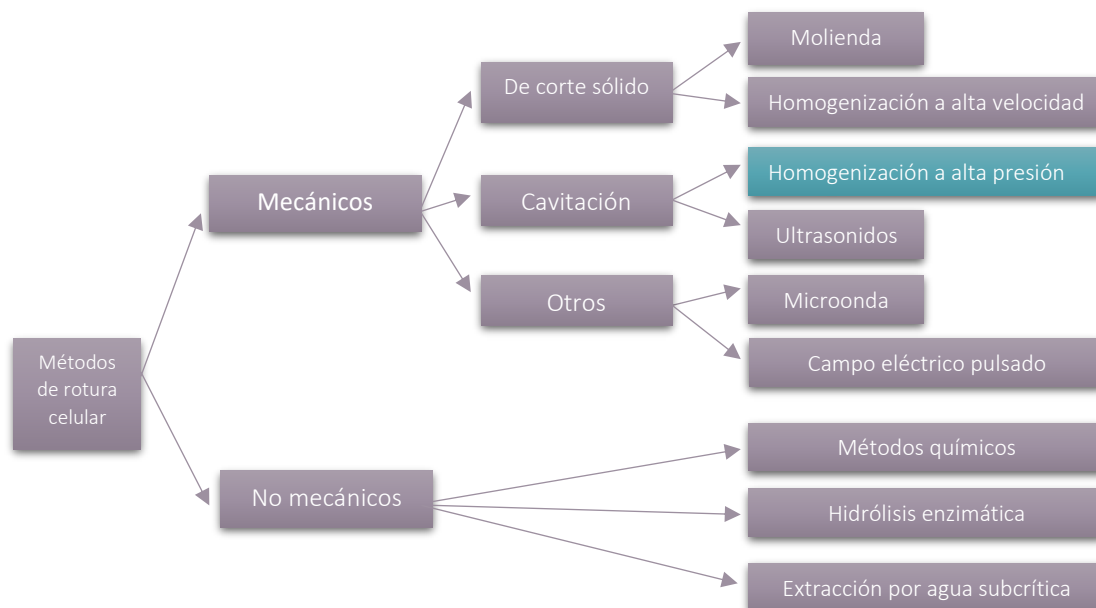


Figura 7: Clasificación de los métodos de rotura celular utilizados en microalgas. Fuente: Roux et al. (2017).

Por un lado, los métodos de rotura mecánica consumen una alta energía, proporcional al volumen a tratar, pero generalmente proporcionan altos rendimientos de recuperación del producto con buena capacidad de control y escalabilidad, además de tener la ventaja de ser continua, sin adición de materia (ácidos, enzimas, disolventes, etcétera) que simplifican el procesamiento posterior (Angles et al., 2017). Destacar que estos métodos solo se pueden utilizar con el objetivo de extraer lípidos debido a las altas presiones, estrés y temperatura a los que son sometidos (Lee et al., 2017).

En segundo lugar, los métodos de rotura celular no mecánicos utilizan productos químicos o biológicos que interactúan directamente con la pared celular permitiendo a los componentes intracelulares su salida al medio (Dong et al., 2016). Estos métodos no mecánicos se pueden dividir en químicos y biológicos:

- Los métodos químicos en microalgas utilizan ácidos, disolventes, sales, nanopartículas y surfactantes para la rotura de la pared celular. La selectividad y eficiencia de estos compuestos dependen mayoritariamente de la composición y estructura de la pared celular (Lee et al., 2017).
- Los métodos biológicos implican tratamientos con enzimas líticas (por ejemplo: celulasas, proteasas y lipasas), o con microorganismos algicidas (por ejemplo: bacterias, cianobacterias y virus) (Demuez et al., 2015). Sus mayores ventajas son la especificidad biológica, condiciones de operación suaves y un bajo consumo de energía (Günerken et al., 2015).

Todos estos métodos han sido probados por distintos autores en diferentes microalgas con el objetivo de maximizar las eficiencias de extracción de pigmentos y lípidos. Sin embargo, los resultados se ven influenciados por distintas condiciones de operación que se debe tener en cuenta, como la intensidad, el tiempo de procesamiento, el diseño del reactor, y por las

condiciones químicas y de biomasa como el estado seco o húmedo y la concentración, y por la escala.

Otro hecho importante en estos métodos es que cada uno de ellos ha sido probado tanto para biomasa seca como húmeda, aunque recientemente se ha enfocado la utilización de biomasa húmeda ya que permite economizar los costos de energía evitando el secado (*Lee et al. 2017*). Esto es debido a que el proceso de deshidratación y secado de microalgas requiere gran consumo de energía, además de que las características morfológicas celulares y de la pared celular se pueden ver afectadas tras el proceso (*Park et al., 2015*).

Lee et al. (2017) plantean que, en aplicaciones industriales, la rotura de células y la extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas convendría hacerlas en el cultivo directamente. Además, llevarlo a cabo con un sistema acuoso simultáneo permitiría la rotura celular y la separación del producto en un único paso. Nuevas tecnologías en la alteración de las células de las microalgas, como las nanopartículas de Fe_3O_4 con surfactantes y el uso de electrodos fotocatalíticos porosos podrían proporcionar la rotura celular espontánea y la separación de componentes intracelulares de gran valor.

Entre todos los métodos citados merece especial atención la rotura celular a alta presión en esta revisión bibliográfica debido a que permite la extracción de lípidos polares y no polares por separado.

6.1.1 HOMOGENIZACIÓN A ALTA PRESIÓN

La homogenización a alta presión consiste en producir la cavitación de la célula utilizando un flujo de líquido desde un área grande hacia una zona pequeña de constricción, donde la velocidad del líquido aumenta y la presión disminuye. Si la presión disminuye por debajo de la presión de saturación del vapor aparecen burbujas, las cuales producirán daños en las membranas de las células cuando la presión vuelva a incrementarse (*Milano et al., 2016*).

6.2 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES

Debido a que la cantidad de lípidos en microalgas es relativamente pequeña (entre un 15% y un 30% de su biomasa total, según la especie), el proceso de extracción debe de ser lo más eficiente posible para maximizar la cantidad final de lípidos obtenidos.

En general, diferentes tecnologías de extracción y sistemas de disolventes han sido descritos en literatura, centrándose la mayoría de ellos en la producción de biodiésel y, por tanto, en la extracción de lípidos neutros, como triacilglicéridos y ácidos grasos libres, y no en los lípidos polares, como fosfolípidos y glicolípidos (*Servaes et al., 2015; Huang y Kim, 2017*).

La extracción de lípidos polares procedentes de microalgas a escala de laboratorio se ha llevado a cabo por diferentes métodos: físicos, químicos utilizando disolventes orgánicos y agua (formación de sistemas ternarios bifásicos, formados por tres componentes que, modificando las proporciones relativas, dan lugar a sistemas bifásicos), entre otros. La extracción con disolventes se muestra como el enfoque más viable hasta la fecha (*Molina Grima et al., 2012*) y es este método de extracción el que se detallará en esta revisión.

6.2.1 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES CON DISOLVENTES

Los lípidos se extraen de la matriz celular de la microalga tras una exposición de esta con un disolvente de extracción. Los principios químicos por los que ocurre este hecho se basan en el concepto 'like dissolves like' (Halim et al., 2012), expresión utilizada para explicar la relación entre disolvente, soluto y las polaridades de ambos: un disolvente polar no puede disolver un soluto no polar, y viceversa.

La polaridad de los lípidos es una característica que hay que tener en cuenta durante su extracción, ya que está relacionada con la distribución de lípidos dentro de la célula algal y la asociación de estos a otras moléculas no lipídicas. Los lípidos polares en las células de microalgas están localizados mayormente en la membrana plasmática y en la membrana de cloroplastos. Además, pueden aparecer asociados entre ellos a través de puentes de hidrógeno, con membranas o con proteínas, dificultando la extracción, debido a que el disolvente debería de romper la membrana celular y las uniones entre lípidos y proteínas de membrana (Molina Grima et al., 2012).

Se ha demostrado que los disolventes orgánicos polares, como metanol o isopropanol, pueden romper las asociaciones entre lípidos y proteínas. El mecanismo consiste en cinco pasos (Fig. 8) (Halim et al., 2012):

- 1) El disolvente orgánico, mezcla de uno polar y no polar, penetra a través de la membrana hasta el citoplasma.
- 2) Interactúa con el complejo lipídico.
- 3) El disolvente no polar rodea al complejo lipídico y forma enlaces de Van der Waals con los lípidos neutros del complejo, mientras que la parte polar del disolvente forma puentes de hidrógeno con los lípidos polares del complejo. El resultado de estas interacciones es la formación de complejos disolvente-lípido que se disgregan de la membrana celular.
- 4) Los complejos formados difunden a través de la membrana celular.
- 5) Por último, los complejos difunden a través de la película estática de disolvente orgánico formado previamente que rodeaba a la célula.

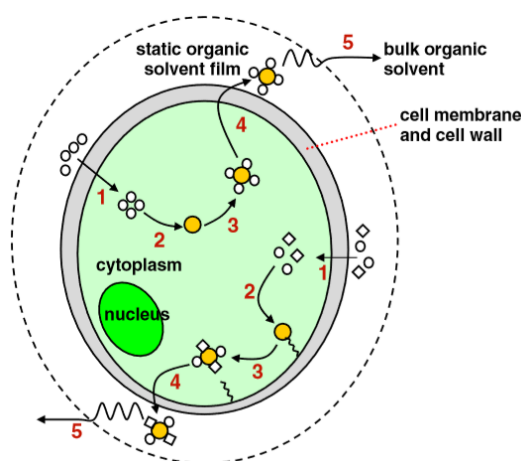


Figura 8: Esquema propuesto para el mecanismo de extracción con disolventes orgánicos (Extraído de Halim et al. 2012).

Por otro lado, un alto contenido de humedad en la biomasa de microalgas impide que los diferentes métodos de extracción tradicionales funcionen correctamente. En consecuencia, Lin Chen *et al.* (2016) propusieron un método mejorado de extracción de lípidos, caracterizado por el uso de una solución acuosa como surfactante, el cual mejora la solubilidad del disolvente en la solución acuosa (Naksuk *et al.*, 2009), combinando lisis térmica y enzimática en la microalga *Nannochloropsis oceanica*. En su artículo publicado, confirman que obtuvieron una eficiencia de extracción de lípidos del 88,3% y de proteínas del 62,4%. No obstante, aunque los métodos tradicionales obtuviesen una eficiencia mayor del 90%, aseguran que con este método mejorado propuesto se evita un gran gasto de energía para eliminar la humedad y el uso de disolventes orgánicos, eludiendo los prejuicios ambientales que producen. Las ventajas de este método mejorado frente a otros métodos serían (Chen *et al.*, 2016):

- Acción directa sobre la suspensión de microalgas que posea un 96% de humedad.
- Características no tóxicas.
- Extracción de lípidos y proteínas en un único proceso.
- Menor coste económico. Dado que la deshidratación de las biomásas de microalgas más allá de la consistencia de una pasta consume mucha energía, será económicamente beneficioso si la tecnología de extracción de lípidos seleccionada es efectiva cuando se aplica directamente a la materia prima húmeda (Halim *et al.*, 2012).

Del mismo modo, este equipo de investigadores asegura que, aunque el uso de surfactantes aumenta la eficiencia de extracción de lípidos en medio húmedo, la barrera física de la pared celular y las uniones de proteínas alrededor de los cuerpos lipídicos son los principales limitantes de los métodos de extracción llevados a cabo hasta la fecha. Por ello, añaden un estudio de la eficiencia de extracción de lípidos y proteínas cuando se lleva a cabo un tratamiento de lisis térmica y enzimática a la microalga, obteniendo los siguientes resultados de la *tabla 9*.

Tabla 9: Efecto del proceso de la rotura de la pared celular en microalgas en la eficiencia de extracción de lípidos y proteínas en ocho ensayos distintos. Nota: '1' indica tratamiento positivo, '-1' indica que no se ha llevado a cabo el tratamiento. Fuente: Chen *et al.* 2016

	LISIS TÉRMICA	LISIS ENZIMÁTICA	EXTRACCIÓN ACUOSA	EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN (%)	
				LÍPIDOS	PROTEÍNAS
1	-1	-1	-1	2,2 ± 0,6	6,9 ± 0,1
2	1	-1	-1	13,9 ± 2,1	28,5 ± 0,6
3	1	1	-1	54,6 ± 5,2	53,3 ± 4,2
4	1	1	1	88,3 ± 0,8	62,4 ± 1,9
5	-1	1	-1	18,7 ± 5,3	26,1 ± 0,1
6	-1	1	1	28,8 ± 0,0	29,9 ± 0,0
7	-1	-1	1	7,2 ± 2,4	12,6 ± 2,3
8	1	-1	1	24,5 ± 1,5	31,8 ± 0,6

Como se puede observar en la *tabla 9*, analizaron la eficiencia de los surfactantes acuosos combinados con lisis enzimática y térmica en la rotura celular. La eficiencia de la extracción cuando se combina todos ellos es significativamente superior (88,3%) que para los procesos simples que solo utilizan un único método de lisis. En definitiva, el efecto de la lisis enzimática resulta más adecuado cuando se combina con la lisis térmica, siendo el resultado una completa destrucción de la estructura de la pared celular y un incremento significativo de la eficiencia de la extracción lipídica (Chen *et al.*, 2016).

Por último, cabe destacar que Chen *et al.* (2016) consiguieron que el rendimiento en la extracción de lípidos polares fuese 2,3 veces superior al método tradicional con hexano, permitiendo una subida notable en la eficiencia de la extracción de lípidos polares en un 128,3%. Una posible explicación para esta mejora es la presencia de un disolvente con alta polaridad, como agua o solución de surfactante acuoso, mejorando la captación de los lípidos unidos a la membrana, en su mayoría polares.

Otra dificultad que se puede encontrar durante la extracción lipídica radica en que los ácidos grasos que los componen son susceptibles a sufrir oxidación durante el almacenamiento, provocando una menor biodisponibilidad para su uso. La autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados es un cambio químico que afecta su valor nutritivo y propiedades debido a que se degradan generando otros compuestos. Altas tasas de autooxidación ocurren a temperatura ambiente en todos los PUFA, siendo el resultado de esto la transformación de lípidos en otras macromoléculas deterioradas (Molina Grima *et al.*, 2012). Mora-Gutierrez *et al.* (2018) demostraron que la técnica de microencapsulación minimizaba los efectos negativos de la oxidación de lípidos. Se consiguió estabilidad oxidativa del aceite de algas mediante emulsiones con caseína bovina y transglutaminasa microbiana liposolubles (Jacob y Mathew, 2016).

Previamente a la extracción hay que seleccionar el disolvente más adecuado, siendo este un paso crítico para el desarrollo del proceso. Existen pocos datos en bibliografía sobre la selección de disolventes para lípidos polares, pero se recomienda tener en cuenta los siguientes criterios (Angles *et al.*, 2017):

- Gran capacidad de extracción
- Posibilidad de reciclaje
- Riesgo mínimo para el ser humano
- Garantías de seguridad ambiental
- Disolvente poco soluble en agua para que la recuperación de la fracción lipídica sea más rápida y eficaz, teniendo que formar un sistema de dos fases con agua para eliminar las moléculas no lipídicas (Molina Grima *et al.*, 2012).

Según estos criterios, los disolventes clorados no serían candidatos para su uso a gran escala (Angles *et al.*, 2017).

La mayoría de los métodos descritos en bibliografía usan disolventes orgánicos, como cloroformo, alcoholes (metanol, etanol, isopropanol), hexano, diclorometano, acetato de etilo, además de una mezcla de ellos (Servaes *et al.*, 2015).

La metodología propuesta por Bligh y Dyer en 1959 ha sido la más utilizada para la extracción de lípidos. Esta extracción se lleva a cabo en frío utilizando un sistema disolvente, siendo este el resultado de la mezcla entre un disolvente poco polar (cloroformo), que disuelve lípidos neutros y apolares, y otro polar (metanol), que disuelve los lípidos polares. Igualmente, el agua endógena de la célula de la microalga actúa como un componente ternario que permite completar la extracción de los lípidos. Además, no requiere un secado completo de la biomasa microalgal (Halim *et al.*, 2012). Este método empleaba cloroformo y metanol (con una concentración de 1:2 v/v) pero, debido a la toxicidad de ambos, comenzó a utilizarse hexano e isopropanol (3:2 v/v), los cuales resultaron menos tóxicos y más rápidos ya que trabajan con una mayor selectividad hacia los lípidos polares (Salazar Perez, 2012; Servaes *et al.*, 2015). Este hecho fue observado por primera vez en *B. braunii* en 1998 (Halim *et al.*, 2012).

El agua provoca la hinchazón de las estructuras celulares ricas en polisacáridos, provocando el aumento del grado de dispersión de los sistemas vivos y facilitando el acceso de los disolventes de extracción a los lípidos. Por lo tanto, la presencia de agua es necesaria para que la extracción de lípidos polares sea cuantitativa (Molina Grima et al., 2012).

La mezcla de componentes alcohólicos evita la degradación de lípidos en el proceso de extracción por parte de las enzimas. Por ello, el alcohol es un componente esencial en el disolvente de extracción, además de ser requerido para la rotura de complejos lípidos-proteínas, para la disolución de lípidos, extracción de contaminantes celulares como azúcares, aminoácidos, sales, etcétera (Molina Grima et al., 2012).

Aunque no hay límite, el periodo de extracción puede durar desde treinta minutos hasta tres horas. Después de la extracción, el disolvente debe de ser retirado mediante destilación (a reducidas presiones y temperaturas entre 40-60 °C) (Molina Grima et al., 2012).

Un último ejemplo de metodologías desarrolladas para la extracción de lípidos a partir de microalgas con el uso de disolventes orgánicos sería la publicada en 2017 por Huang y Kim en su artículo *"Simultaneous cell disruption and lipid extraction in a microalgal biomass using a nonpolar tertiary amine"*. Aquí, explican cómo desarrollaron un método de rotura celular y extracción de lípidos simultánea sin necesidad de hacer pretratamientos (secado para evitar la humedad y rotura celular). Este método consiste en la utilización de un sistema de disolvente compuesto por una mezcla de trietilamina y metanol (Huang y Kim, 2017). Para analizar la eficiencia de los lípidos extraídos, sometieron dos muestras de biomasa de microalgas de la misma procedencia y sin pretratamiento previo, a dos mezclas de disolventes distintas: trietilamina/metanol y cloroformo/metanol (2:1, v/v). Como resultado, obtuvieron que la proporción 3:7 de trietilamina/metanol consigue una extracción del 92,5 % de los lípidos totales de la biomasa húmeda de microalga (fig. 9), correspondiendo a un 150% de la extracción con el sistema de disolvente cloroformo/metanol (Huang y Kim, 2017).

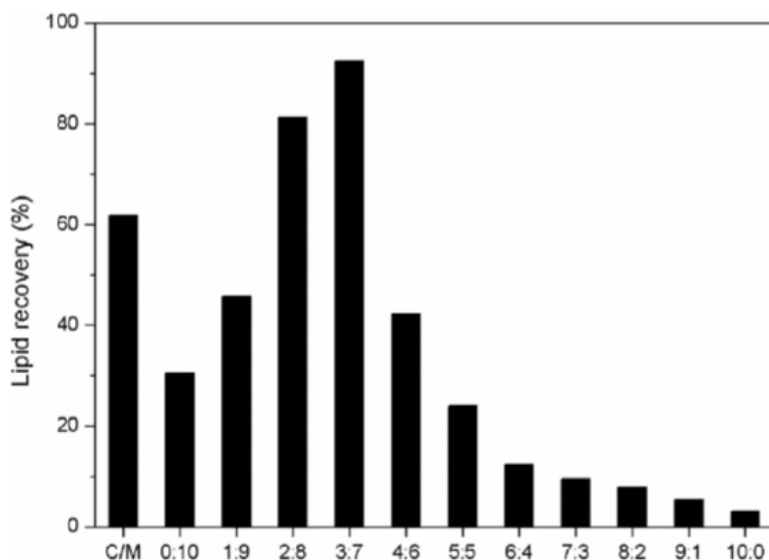


Figura 9: Recuperación de lípidos usando mezclas de trietilamina/metanol con distintas proporciones de volumen. C/M: mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Fuente: Huang et al. (2017).

Según estos autores, durante el proceso de extracción, la trietilamina (disolvente orgánico no polar) penetra a través de la pared celular e interactúa con los lípidos neutros, mientras que el metanol (disolvente orgánico polar) forma puentes de hidrógeno con los lípidos polares del complejo lipídico del citoplasma unidos a las proteínas de membrana. El metanol rompe las uniones entre el complejo lipídico y las proteínas de membrana de la célula de microalga y, como resultado, el complejo disolvente-lípido formado se difunde a través de la célula gracias a los gradientes de concentración. Así, la novedad de utilización de una amina terciaria no polar podría mejorar a los métodos tradicionales debido a su carácter más económico y energéticamente eficiente, ya que no requiere pretratamientos adicionales como el secado y la rotura celular (Huang y Kim, 2017).

Sin embargo, estos métodos tradicionales de extracción de uso de disolventes presentan algunas desventajas, entre las que se incluyen:

- Uso de disolventes orgánicos peligrosos e inflamables.
- Gran coste en la purificación de los disolventes.
- Presencia de emisiones tóxicas durante la extracción.
- Proceso de extracción lento.
- Requerimiento de un paso de evaporación que consume gran cantidad de energía para la eliminación del disolvente.
- Los disolventes orgánicos pueden causar daños en la salud y en el medio ambiente.

6.2.2 NUEVAS TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES A PARTIR DE MICROALGAS

Para minimizar estos inconvenientes, en los últimos años se ha iniciado la búsqueda y desarrollo de técnicas ‘verdes’ y sostenibles, como la Extracción de Fluidos a Presión (PFE, *pressurized fluid extraction*) y Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE, *supercritical fluid extraction*) (Servaes et al., 2015).

A pesar de que la técnica PFE requiere temperaturas entre 50-200 °C y presiones de 10-15 MPa, este método ha incrementado la solubilidad lipídica y la penetración del disolvente en la pared celular, mientras que reduce las emisiones de compuestos volátiles orgánicos (VOC) debido a las presiones requeridas. Todas estas características se unen para hacer de este método una técnica más sostenible con el medio ambiente en comparación con los métodos tradicionales. Otras ventajas incluyen la opción de la automatización del método y la falta de oxígeno y luz dentro del proceso, lo cual resulta beneficioso cuando se trata de moléculas bioactivas (Servaes et al., 2015).

Por otro lado, el método SFE es una emergente ‘tecnología verde’ con un gran potencial para sustituir los métodos de extracción tradicionales (Halim et al., 2012). Este método tiene como principio básico el hecho de que, cuando la temperatura y la presión del fluido están por encima de sus valores críticos, este entra en una región supercrítica y puede ser utilizado como disolvente en la extracción de lípidos por diferentes motivos (Halim et al., 2012).

- La capacidad del disolver del fluido supercrítico depende de su densidad, la cual puede ser ajustada cambiando las condiciones de presión y temperatura.
- Las características físicas del fluido supercrítico son intermedias entre un líquido y un gas, lo que le proporcionaría una fácil y rápida penetración a través de la célula.
- Los lípidos finales estarían libres de disolventes, por lo que no se consumiría energía para eliminar el disolvente tras la extracción.

El dióxido de carbono supercrítico (SCCO₂) es el principal disolvente utilizado en la mayoría de las extracciones con fluido supercrítico (Halim *et al.*, 2012). Sus condiciones moderadas de temperatura (31,1 °C) y de presión (7,4 MPa), hacen que este método sea especialmente útil para la extracción de fracciones lipídicas termolábiles sin que sufran degradación (Servaes *et al.*, 2015). SCCO₂ permite una extracción segura debido a su baja toxicidad, inflamabilidad y radioactividad (Halim *et al.*, 2012).

Una práctica común para una mayor extracción de lípidos polares en microalgas es el uso de codisolventes (1-10% de metanol y etanol al CO₂ supercrítico). Se ha observado que añadir un 30% de etanol como codisolvente incrementa el rendimiento de la fracción total de lípidos extraídos con respecto al método que solo utiliza SCCO₂, ya que este último es especialmente útil con los lípidos no polares, pero tiene baja solubilidad por los lípidos polares debido a la naturaleza no polar del SCCO₂. El codisolvente actúa como un modificador de la polaridad, aumentando la afinidad del fluido con los lípidos polares (Halim *et al.*, 2012). Mendes *et al.* (1995) demostraron que la adición de metanol a SCCO₂ aumenta la extracción del ácido alfa-linoleico en la microalga *Spirulina máxima* (Halim *et al.*, 2012). Sin embargo, este método produce un gran coste económico (Servaes *et al.*, 2015).

De la misma manera, actualmente se está considerando el acetato de etilo (EtOAc) como un 'disolvente verde', con un reducido impacto al medio ambiente y que podría sustituir a los disolventes clorados en la industria (Angles *et al.*, 2017).

Ryckebosch *et al.* (2014) concluyen que, a pesar de que se estudien las capacidades de extracción de los distintos disolventes, este resultado no puede ser extrapolado generalmente a una microalga. Este hecho es debido a que el factor más importante que determinará el rendimiento de extracción en las distintas especies de microalgas parece ser la permeabilidad de la pared celular de cada una de ellas. En definitiva, aseguran que para cada microalga habría que hacer un estudio previo sobre el tipo de disolvente, o mezclas de disolventes, que se adaptaría mejor para la extracción de sus lípidos polares.

Por ejemplo, K. Servaes *et al.* publican en 2015 un artículo en el que realizan un estudio de los diferentes disolventes nombrados con anterioridad en la especie de microalga *Nannochloropsis oculata*. En la *figura 10* se puede observar que, utilizando cloroformo/metanol (2:1) como disolvente de extracción en los dos métodos tradicionales (Soxhlet y Folch) y en PFE, obtuvieron fracciones lipídicas que van desde el 26 al 32%. Afirman que esta mezcla es útil para extraer tanto lípidos no polares mediante cloroformo, como lípidos polares mediante metanol.

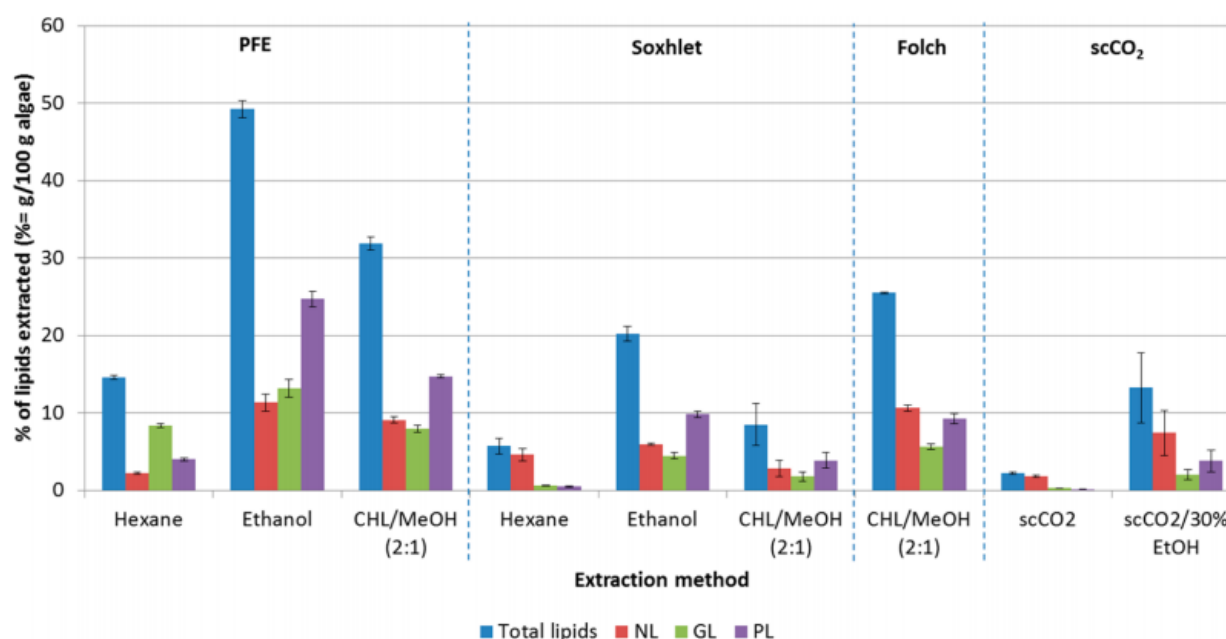


Figura 10: Cantidad total de lípidos y clases lipídicas obtenidas con diferentes métodos de extracción en la microalga *Nannochloropsis oculata*. CHL: cloroformo; MeOH: metanol; EtOH: etanol Fuente: Servaes et al., 2015.

Es por esta razón que las mezclas de cloroformo/metanol suelen ser las más eficientes para la extracción total de lípidos. Sin embargo, la mayor fracción lipídica obtenida en esta especie de microalga fue usando PFE con etanol (49%).

En resumen, basándonos en los resultados de las fracciones de lípidos totales, se puede concluir que la polaridad del disolvente de extracción influye en el rendimiento tanto en los métodos tradicionales (Soxhlet, Folch), como en las técnicas modernas (PFE, SFE). Los disolventes no polares pueden únicamente extraer lípidos no polares, mientras que mezclas de disolventes con distintas polaridades producen un mayor rendimiento de extracción lipídica.

En la actualidad, se sigue la búsqueda de una optimización de la extracción de lípidos polares, incluyendo un balance económico en el que se analicen pros y contras de las distintas mezclas de disolventes y el uso de codisolventes en las especies de microalgas consideradas como ricas en lípidos polares y ω -3 PUFA buscando conseguir concentrados de lípidos polares enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados. Por ejemplo, Halim y *et al.* en 2011 concluyeron que, durante la optimización de la extracción lipídica en la especie de microalga *Chlorococcum sp.*, el uso de isopropanol como codisolvente aumentó el rendimiento de la extracción mediante hexano un 300%.

Algunos artículos sugieren la posibilidad de optimizar la extracción de lípidos polares con una previa saponificación de la biomasa, o una transesterificación directa de los lípidos totales desde la biomasa para obtener ácidos grasos ésteres metílicos (FAME) directamente (Molina Grima *et al.*, 2012), pero, estrictamente, ya no se trata de una extracción de lípidos.

6.3 ENRIQUECIMIENTO DE LÍPIDOS POLARES CON ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Tras la extracción de los lípidos polares a partir de las microalgas, los aceites obtenidos son una fuente abundante de ácidos grasos poliinsaturados (Wang *et al.*, 2015). Estos lípidos polares forman un grupo complejo de moléculas que difieren en la cantidad de ácidos grasos y grupos polares presentes en ellas (Adlercreutz *et al.*, 2001), incluyendo a algunos no recomendables para el consumo humano directo dado que puede encontrarse ácido palmítico en la posición *sn*-1 y *sn*-3 de la estructura de la molécula (Wang *et al.*, 2015). La importancia sobre la salud humana y, por tanto, la demanda de mercado, ha provocado el desarrollo de fosfolípidos con una estructura específica y una gran pureza, destacando a aquellos destinados a la nutrición y a formar parte de fármacos (Guo *et al.*, 2005).

Puesto que buscamos un producto final específico, lípidos polares enriquecidos y concentrados en PUFA (especialmente en ω -3), los dos caminos encontrados en bibliografía son la síntesis *nov*o o la modificación de los lípidos naturales extraídos previamente (Adlercreutz *et al.*, 2003), siendo el último el que desarrolla en este punto.

Siguiendo lo señalado durante toda esta revisión, y gracias a los beneficios de los PUFA remarcados anteriormente, se mencionan las distintas tecnologías llevadas a cabo para enriquecer, tras la extracción de lípidos polares (mayoritariamente los glicerofosfolípidos y los lisofosfolípidos) con ácidos grasos poliinsaturados, mencionando especialmente al ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6).

El interés por la modificación de la estructura de los glicerofosfolípidos (Fig. 11) radica en que, al contrario que otras especies de fosfolípidos, han sido especialmente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica gracias a su carácter anfipático y su capacidad de surfactante natural (Guo *et al.*, 2005). Por otro lado, los lisofosfolípidos son glicerofosfolípidos que no han sido esterificados con un residuo de ácido graso en la posición *sn*-1 o *sn*-2 (Baeza-Jiménez *et al.*, 2013). Aunque también existen algunos métodos realizados para la concentración de esfingolípidos ricos en PUFA, sus características y variaciones en sus moléculas ha provocado que no haya sido objeto de estudio de interés (Guo *et al.*, 2005).

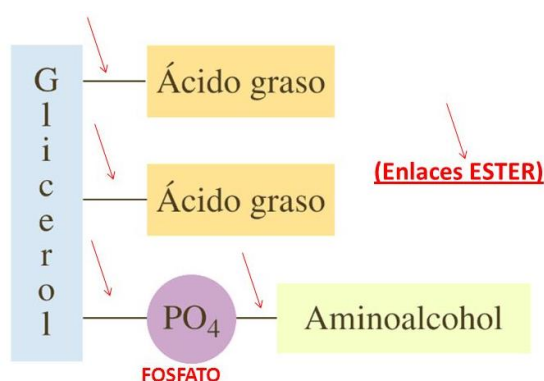


Figura 11: Estructura de un glicerofosfolípido, formado por dos ácidos grasos unidos, un grupo fosfato y un grupo amino, todos ellos unidos al esqueleto glicerol mediante enlaces éster.

Tras la amplia revisión bibliográfica, se ha observado que han sido propuestos tanto métodos químicos como enzimáticos con el objeto de modificar las características de los lípidos (Adlercreutz *et al.*, 2001). Estos avances en la bioquímica y la biología molecular de lípidos han dado como resultado un progreso notable de la ciencia y tecnología de fosfolípidos. En consecuencia, algunas enzimas, especialmente fosfolipasas, poseen especial protagonismo en

los procesos biológicos redactados y han sido descubiertas, aisladas, caracterizadas y clonadas gracias a técnicas biotecnológicas (Guo *et al.*, 2005).

Dada la gran cantidad de técnicas, métodos y enzimas utilizados, se han seleccionado los tipos de enzimas y métodos realizados más generalizados, referenciando los autores e investigaciones más recientes y destacados por los rendimientos obtenidos en el objetivo propuesto. Por lo contrario, los métodos químicos (como la acetilación, hidroxilación, hidrogenación, etcétera) solo fueron desarrollados alrededor del año 2000 debido las ventajas de los métodos enzimáticos frente a los químicos, por lo que no se han tratado en esta revisión. Entre las ventajas, Guo *et al.*, 2005 destacan:

- Alta selectividad o especificidad de las enzimas, haciendo la modificación de los fosfolípidos más simple y fácil.
- Las reacciones enzimáticas transcurren, normalmente, en condiciones normales, haciendo que la molécula lipídica no sufra modificaciones indeseadas.
- Reducen el uso de disolventes tóxicos que, además de simplificar el paso de purificar el residuo de disolvente en el producto final, proporciona una modificación alternativa segura de los fosfolípidos para el ámbito alimentario, farmacéutico y cosmético.
- Posibilidad de llevar a cabo diferentes rutas de reacción con una misma enzima, produciendo productos intermedios de interés.

Desde hace más de cuarenta años, la hidrólisis catalizada por lipasas está siendo considerada como el proceso más selectivo y sencillo para obtener concentrados de ω -3 PUFA (Kahveci y Xu, 2011). Sin embargo, no fue hasta alrededor del año 2000 cuando los métodos enzimáticos empezaron a ser el centro de las prácticas de modificación de las características de lípidos polares (Devos *et al.*, 2006), destacando el uso de lipasas, las cuales catalizan las reacciones de hidrólisis, esterificación o transesterificación, aunque también se han utilizado fosfolipasas que hidrolizan los enlaces éster de los fosfolípidos.

La característica más importante de la hidrólisis catalizada por lipasas (EC 3.1.1.3) es la discriminación de estas hacia los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (He *et al.*, 2017), dando como resultado la modificación de los grupos acilo del fosfolípido (Guo *et al.*, 2005). Especialmente el EPA y el DHA están protegidos de la acción de la lipasa debido a las características de sus estructuras moleculares: la conformación de los dobles enlaces carbono-carbono en *cis* en los ω -3 PUFA causa un impedimento estérico provocando la flexión de las cadenas de ácidos grasos, lo que hace que los grupos metilo terminales estén muy cerca de los enlaces éster y que la enzima no pueda alcanzar este tipo de enlace que une a los PUFA con el esqueleto de glicerol de los fosfolípidos (Kahveci y Xu, 2011).

De acuerdo con las características biocatalíticas y la gran versatilidad de las lipasas, se considera que el 25% de las enzimas utilizadas en biotecnología pertenecen a este grupo (Jacob y Mathew, 2016; Devos *et al.*, 2006). Es bien conocido que las fosfolipasas poseen un papel importante en mamíferos y plantas en relación con la regulación celular, metabolismo y biosíntesis de fosfolípidos, las cuales han sido encontradas y/o clonadas en microorganismos. Estas fosfolipasas procedentes de bacterias y hongos presentan una especificidad catalítica igual, e incluso mejor, en la biocatálisis, por lo que se utilizan como la herramienta principal en la modificación de fosfolípidos (Guo *et al.*, 2005).

La razón por la que ha llamado la atención el uso de fosfolípidos como fuente de ω -3 PUFA, y no otro tipo de lípidos, fue observada por Marie Devos et al. (2006), concluyendo que los fosfolípidos (o glicerofosfolípidos) y los lisofosfolípidos, pueden ser mejores transportadores de ω -3 PUFA que los triacilgliceroles. En el estudio de la microalga *Isochrysis galbana*, obtuvieron que la mayoría de DHA se encuentra en los fosfolípidos (Fig. 11)

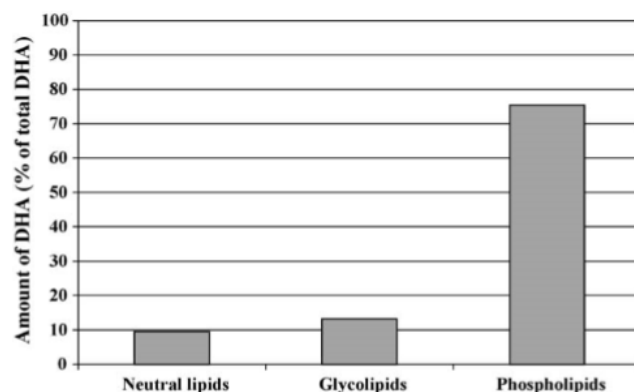


Figura 11: Porcentaje de DHA total en fosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutros en la microalga *I. galbana*. Fuente: M. Devos et al. (2006).

6.3.1 USO DE LIPASAS Y FOSFOLIPASAS EN METODOLOGÍAS ENZIMÁTICAS

En metodologías enzimáticas realizadas, de forma generalizada, las lipasas han sido utilizadas para intercambiar los ácidos grasos de la posición *sn*-1 de los fosfolípidos, mientras que la fosfolipasa A₂ (EC 3.1.1.4) es útil para llevar a cabo el intercambio en la posición *sn*-2 (Adlercreutz et al., 2003). De cualquier manera, el ácido graso original en una determinada posición es eliminado mediante una hidrólisis enzimática de la molécula, mientras que un nuevo ácido graso de interés puede ser introducido utilizando la misma enzima en una reacción de esterificación (Adlercreutz et al., 2003).

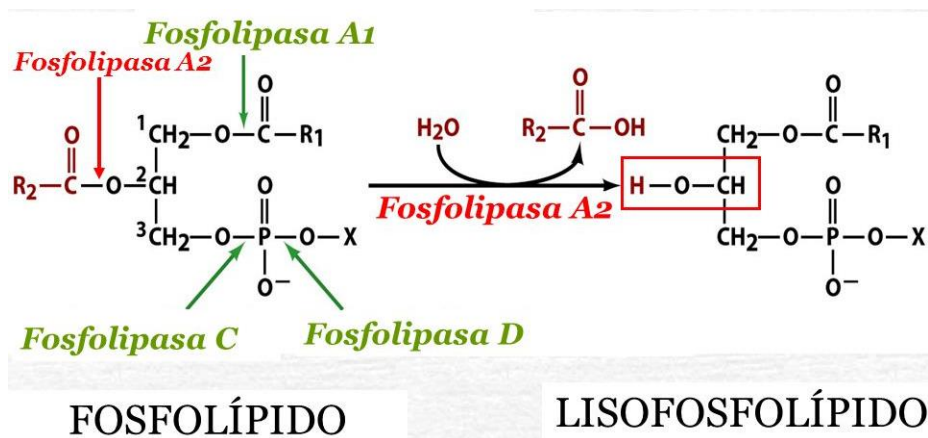


Figura 12: Hidrólisis de fosfolípidos catalizada por fosfolipasas. A la izquierda, la estructura molecular de un fosfolípido y, tras la acción de una fosfolipasa, la estructura de un lisofosfolípido a la derecha cuando ocurre la eliminación de un ácido graso. Las enzimas pueden ser utilizadas para romper o formar enlaces éster en diferentes posiciones de la molécula de fosfolípido.

En un primer lugar, dentro del grupo de fosfolipasas nos encontramos a la fosfolipasa A₁ (EC 3.1.1.32), que constituye un grupo muy diverso de fosfolipasas con actividad 1-acil hidrolasa (Guo et al., 2005). Aunque la fosfolipasa A₁ puede ser usada para las modificaciones de la posición *sn*-1 de los glicerofosfolípidos, es más conveniente el uso de lipasas específicas para la

posición *sn*-1 y *sn*-3 (Adlercreutz *et al.*, 2001; Adlercreutz *et al.*, 2003). Por lo tanto, aunque hay algunas fosfolipasas A₁ disponibles en el mercado, no están siendo utilizadas para las modificaciones en los fosfolípidos (Adlercreutz *et al.*, 2003).

Igualmente, para la modificación de la posición *sn*-2 de los glicerofosfolípidos, la fosfolipasa A₂ (PLA₂) es la enzima comúnmente elegida (Adlercreutz *et al.*, 2003). La fosfolipasa A₂ pancreática porcina ha sido tradicionalmente la más usada en este método (Adlercreutz *et al.*, 2001) observándose que una alta concentración de Ca²⁺ puede incrementar la actividad de la enzima aunque no participe en la catálisis (Guo *et al.*, 2005).

La fosfolipasa que puede hidrolizar las dos posiciones del acilo, *sn*-1 y *sn*-2, se denomina fosfolipasa B (EC 3.1.1.5) y han sido caracterizadas y clonadas algunas de ellas procedentes de *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Penicillium notatum* (Guo *et al.*, 2005).

Por último, la fosfolipasa C (EC 3.1.4.3) procedente de *Bacillus cereus* ha sido la más estudiada, mientras que el grupo de fosfolipasas D (EC 3.1.4.4) está compuesto por un gran número de diferentes enzimas que han sido utilizadas por diferentes autores, procedentes de plantas (como la col) y microorganismos (por ejemplo, *Streptomyces*). Ambas fosfolipasas presentan actividad similar como fosfodiesterasas, uniendo el enlace fósforo-oxígeno entre el glicerol y fosfato (la C) y el fosfato al grupo polar (la D) (Guo *et al.*, 2005). La característica más importante del grupo de fosfolipasas D es su alta especificidad por el sustrato, por lo que han sido ampliamente utilizadas para la síntesis de una gran cantidad de fosfolípidos (Adlercreutz *et al.*, 2001).

Centrándonos en las fosfolipasas D, pueden actuar en dos enfoques distintos (Adlercreutz *et al.*, 2001):

- 1) Actuando como transferasa, la reacción se realiza en un único paso. Su inconveniente principal es el requerimiento de una gran cantidad de PUFA para que pueda ser incorporado a la molécula, ya que existe una competencia entre este ácido graso y el presente en el lípido del sustrato.
- 2) Enfoque de hidrólisis-esterificación, son necesarios dos pasos de reacción y entre ellos un paso de separación, necesario este último para eliminar el ácido graso reemplazado de la molécula. Este hecho permite obtener de muy alta pureza. También existe la necesidad de incorporar una alta concentración de ácido graso para obtener un buen rendimiento en la reacción esterificación.

En literatura, el enfoque de un solo paso es el más comúnmente utilizado (Adlercreutz *et al.*, 2001).

De igual manera, las lipasas representan un gran número y variedad de enzimas usadas en la modificación de grasas, aceites, detergentes, etcétera (Guo *et al.*, 2005). Tanto las lipasas como la fosfolipasa A₂ pueden catalizar la escisión y formación del enlace del éster entre el glicerol, presente en la estructura principal del fosfolípido, y el PUFA nuevo a introducir (Adlercreutz *et al.*, 2003).

Sin embargo, P. Adlercreutz *et al.*, en su artículo publicado en 2003, señalan que la incorporación de un nuevo ácido graso en la posición *sn*-1 es más favorable que en la *sn*-2 debido a las constantes de equilibrio de la reacción, además de que las lipasas pueden ser usadas con menor cantidad de actividad de agua que las fosfolipasas A₂. Se ha señalado también que la mayoría de las lipasas son más estables que las fosfolipasas, estando disponibles comercialmente tanto en

forma libre como inmovilizadas. Muchas de las lipasas comparten secuencias idénticas a las fosfolipasas A₁ y A₂, presentando actividad similar a ellas (Guo et al., 2005).

Una enzima utilizada típicamente para las modificaciones hidrolíticas es la lipasa procedente de *Rhizopus arrhizus* (Adlercreutz et al., 2001). Entre las lipasas ensayadas más recientemente, la enzima de la levadura *Candida cylindracea* ha sido de especial interés ya que demostró ser un catalizador inespecífico de muchas reacciones (comercialmente interesantes) tales como la modificación de aceites y grasas (Jacob y Mathew, 2016).

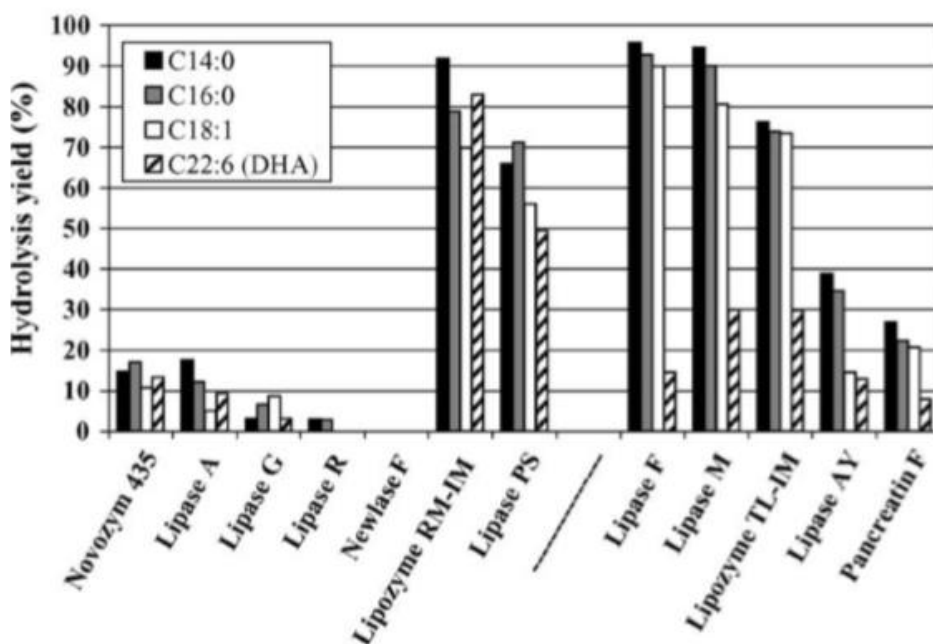


Figura 13: Distintas lipasas utilizadas para la hidrólisis y los rendimientos obtenidos. Fuente: Devos et al. 2016.

Las lipasas F y M presentan la mayor habilidad de discriminación por los ω -3 PUFA, obteniendo para ambas un gran incremento en la proporción de DHA en la fracción lipídica a lo largo del tiempo de la hidrólisis y un mayor rendimiento en la hidrólisis para ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

J.P Jacob y Saleena Mathew, en su artículo “Effect of lipases from *Candida cylindracea* on enrichment of PUFA in marine microalgae” (2016) realizaron ensayos con la lipasa procedente de *C. cylindracea* en distintas especies de microalgas (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella marina* y *Tetraselmis gracillus*). Las diferencias de rendimientos entre las microalgas se pueden afirmar en este estudio, en el que para una misma lipasa (procedente de *C. cylindracea*), obtuvieron distintas condiciones óptimas (tiempo de reacción y concentración de enzima), según la microalga utilizada (tabla 10).

Tabla 10: realizada recopilando los datos obtenidos de Jacob y Mathew (2016), estudio en el que determinaron las diferentes concentraciones de enzima lipasa y tiempo de reacción óptimos para distintas especies de microalgas.

Microalga	<i>I. galbana</i>	<i>C. calcitrans</i>	<i>Dunallella spp</i> y <i>Chlorella spp</i>	<i>T. gracillus</i>
Tiempo de reacción (horas)	8	24	4	4
Concentración de enzima (U)	4	8	4	12

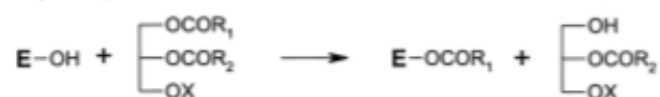
6.3.2 DESARROLLO DE LOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Volviendo la mirada hacia los métodos llevados a cabo para el enriquecimiento, P. Adlercreutz *et al.* (2003) afirman que, desde un punto de vista práctico, se pueden distinguir dos procesos:

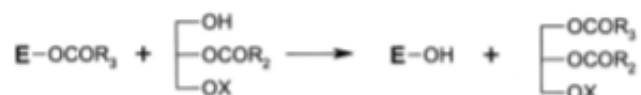
- 1) *‘One-step’*: tanto el proceso de hidrólisis como esterificación ocurren simultáneamente, siendo este último el que determinará el máximo rendimiento de la reacción. Aunque el hecho de que se produzca en un único paso puede ser una ventaja, los autores afirman que su gran desventaja radica en que el producto final poseerá una mezcla de ácidos grasos originales y los PUFA incorporados. Para evitar esta situación, una gran cantidad de PUFA deben ser añadidos a la reacción.
- 2) *‘Two-step’*: los ácidos grasos que originalmente están en la posición *sn-1* son inicialmente intercambiados mediante una hidrólisis. El lisofosfolípido que se forma es aislado para, posteriormente, ser esterificado con un nuevo ácido graso, siendo este el segundo paso del método y el que determinará el rendimiento de la reacción ya que es una reacción reversible y la mayor eficiencia es obtenida cuando alcanza el equilibrio.

Ambos procesos han sido utilizados en la práctica para el intercambio de ácidos grasos en glicerofosfolípidos, y la elección del uso de uno u otro suele depender de la pureza del producto deseado. En esta revisión bibliográfica nos interesaría obtener lípidos polares enriquecidos en PUFA en un alto grado de pureza, por lo que un proceso *‘two-step’* podría proporcionar mayores ventajas, aunque el proceso sea más laborioso y requiera tiempo de reacción mayor (Adlercreutz *et al.*, 2003).

Hydrolysis



Esterification



Net reaction

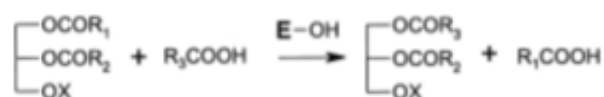
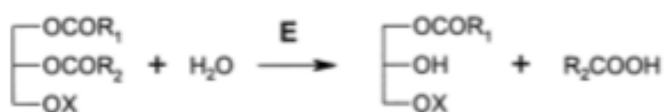
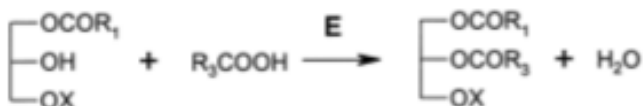


Figura 14: Esquema de la reacción catalizada por una lipasa en el que se lleva a cabo un intercambio de un ácido graso en la posición sn-1 de un glicerofosfolípido. La hidrólisis y esterificación pueden llevarse a cabo de forma separada ('two-step') o simultáneamente ('one-step'). La reacción neta es igual en ambos casos. Fuente: Devos et al. (2016).

Hydrolysis



Esterification



Net reaction

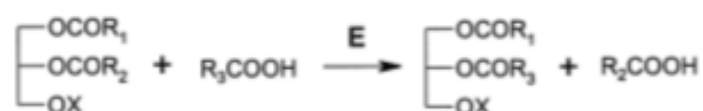


Figura 15: Esquema de la reacción catalizada por la fosfolipasa A₂ en la que se produce el intercambio de un ácido graso en la posición sn-2 de un glicerofosfolípido. La hidrólisis y esterificación pueden llevarse a cabo de forma separada ('two-step') o simultáneamente ('one-step'). La reacción neta es igual en ambos casos. Fuente: Devos et al. (2016).

Derya Kahveci y Xuebing Xu, en 2011, contribuyeron en la mejora de una hidrólisis 'two-step', añadiendo seguidamente otra hidrólisis en el aceite después de eliminar los ácidos grasos libres mediante una destilación de corto recorrido. Esto incrementó el rendimiento del contenido de ω-3 PUFA en el aceite en un 300%. Para su trabajo utilizaron la lipasa procedente de *Candida rugosa* (CRL), la cual posee de sustrato específico a los ácidos grasos saturados y a los

monoinsaturados, dejándolos como ácidos grasos libres y recuperando los ω -3 PUFA en la fracción de acilglicéridos.

4.1.1.1 PUNTOS A CONSIDERAR DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIDRÓLISIS

Para trasladar la reacción de hidrólisis del laboratorio a gran escala hay que tener en cuenta una serie de pasos (Kahveci y Xu, 2011):

- Separación de la fase acuosa (agua y lipasa) del aceite, el cual se purifica posteriormente.
- Los ácidos grasos libres producidos pueden ser eliminados mediante fraccionamiento lipídico, como cromatografía en columna, extracción con disolvente y destilación de corto recorrido.

Algunos parámetros de reacción son considerados muy importantes por su influencia en la reacción de esterificación y transesterificación entre el grupo acil donador y el fosfolípido (tabla 11) (Guo et al., 2005).

Tabla 11: Factores que afectan al equilibrio de la reacción y a la eficiencia enzimática. Fuente: Guo et al. (2015).

FACTORES	OBSERVACIONES
Enzima	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fosfolipasa A₁ y A₂ o lipasas pueden ser utilizadas. ▪ El incremento de la cantidad de enzima provoca mayor rendimiento. ▪ Las enzimas pueden tener diferente reactividad según los grupos polares de los fosfolípidos.
Agua	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se debe mantener un cierto ambiente con cierta cantidad de agua para tener una alta actividad enzimática. ▪ El tiempo de reacción para alcanzar el equilibrio se incrementa cuando disminuye la actividad del agua. Este hecho depende de la enzima, ya que algunas lipasas son activas a baja actividad de agua y hace posible obtener altos rendimientos. ▪ La actividad del agua influye en la organización molecular del fosfolípido, ya que su densidad aumenta con la disminución de la actividad del agua.
Donación de acilo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Al utilizar un gran exceso de ácidos grasos libres, se inhibe la reacción de hidrólisis. ▪ Por lo general, no es un problema usar una concentración alta de donantes de acilo, aunque se ha observado una ligera disminución en la velocidad de reacción para concentraciones muy altas. ▪ Generalmente los ácidos grasos libres son acil donadores más eficientes que los ésteres. ▪ La reactividad se relaciona con la longitud de la cadena y el grado de saturación.
Disolvente	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduce la viscosidad de los sustratos y, como consecuencia, aumenta el rendimiento de la reacción al mejorar la transferencia de masa. ▪ La reacción depende de la polaridad del disolvente. ▪ La solubilidad del sustrato depende del tipo del disolvente.
Tiempo de reacción	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cuanto más tiempo de reacción, mayor grado de incorporación de grupos acilos en los fosfolípidos, hasta el equilibrio. ▪ Cuanto más tiempo de reacción, mayor migración de grupos acilo.
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La temperatura óptima cambia según el tipo de enzima. ▪ Un incremento de temperatura puede resultar en una mayor migración de grupos acilo. ▪ Las altas temperaturas reducen la viscosidad del medio de reacción. ▪ La estabilidad de la enzima tiene una relación inversa con la temperatura.

Con el fin de mejorar la fracción de fosfolípidos, es importante conocer la posición de los ácidos grasos poliinsaturados en ellos. Muchas investigaciones han demostrado que el DHA en fosfolípidos está mayormente localizado en la posición *sn*-2, mientras que el EPA está predominantemente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 (Akanbi et al., 2013).

Para conocer la posición de los PUFA en los lípidos en *I. galbana*, Devos *et al.* (2006) llevaron a cabo una hidrólisis utilizando una fosfolipasa A₂ (Lecitasa 10L). Una vez transcurridas 24 horas de reacción, observaron que el 78% del DHA había sido liberado, por lo que concluyeron que este está presente mayoritariamente en la posición *sn*-2 de los fosfolípidos. Sobre este hecho J.P Jacob y S. Mathew (2017) confirman que la fosfolipasa A₂ puede ser utilizada para enriquecer en DHA la posición *sn*-2 los fosfolípidos.

En este sentido, se concluye que el DHA, al ser más resistente a la hidrólisis comparado por EPA debido a que posee un doble enlace más en su molécula, se observa en mayor cantidad en los lípidos polares enriquecidos obtenidos como producto final de la hidrólisis (Kahveci y Xu, 2011).

Un ejemplo claro de este hecho se representa en la *figura 16* extraída de Akambi *et al.* (2013), observándose el porcentaje de EPA y DHA en la fracción de ácidos grasos libres tras la hidrólisis llevada a cabo por una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. Como podemos observar, la fracción de EPA es mucho mayor que la de DHA.

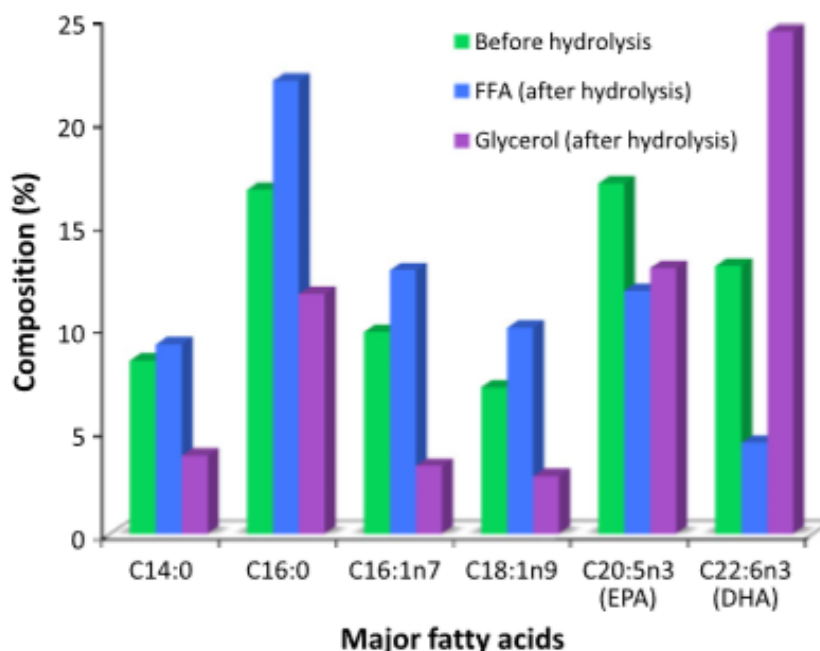


Figura 16: composición, en tanto por ciento, de la cantidad de diferentes ácidos grasos libres tras el proceso de hidrólisis por parte de la lipasa procedente de *T. lanuginosus* (Akanbi *et al.*, 2013).

La investigación llevada a cabo por Barrow *et al.* también aportó que la lipasa procedente de *T. lanuginosus* posee un mayor grado de selectividad hacia el ácido graso que una regioselectividad, ya que en la *figura 16* no se ven cambios en la distribución de los ácidos grasos, afirmando que esta lipasa prefiere hidrolizar EPA antes que DHA tanto en las posiciones *sn*-2 como en la *sn*-1 y *sn*-3.

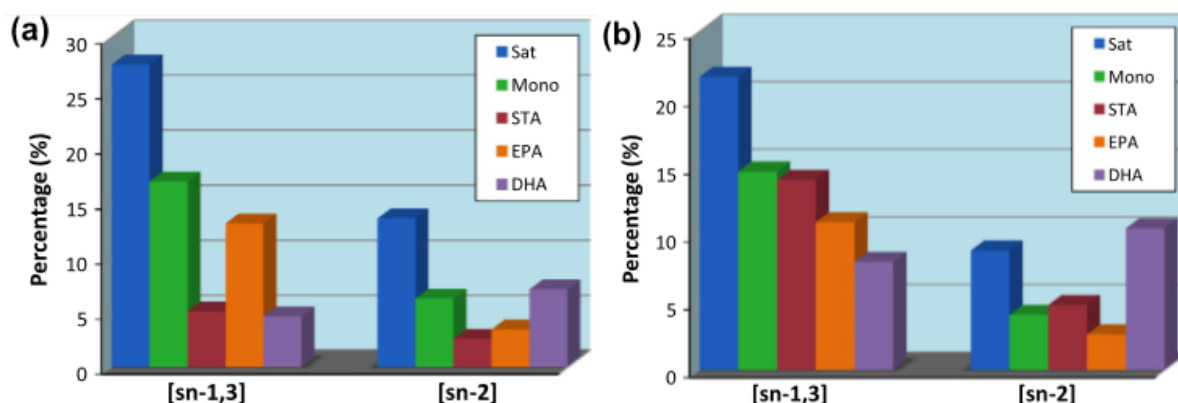


Figura 16: Distribución posicional de ciertos ácidos grasos en el aceite enriquecido antes (a) y después (b) de la hidrólisis (Akanbi et al., 2013).

A estos aspectos hay que añadir el punto de equilibrio durante la reacción. Tanto en el enfoque de dos pasos como en el de un solo paso de las reacciones de intercambio enzimático de ácidos grasos, los lípidos polares parcialmente desacilados (por ejemplo, lisofosfolípidos) constituyen reacciones intermedias. Por lo tanto, la constante de equilibrio en la esterificación de los lisofosfolípidos es un factor importante en el rendimiento de la producción de acilados.

Los parámetros que hay que manipular para obtener un alto rendimiento de lípidos totalmente acilados son (Adlercreutz et al., 2001):

- Concentración de ácidos grasos: debe de ser alta.
- Actividad o concentración de agua: las lipasas para su cambio conformacional requieren agua que, en general, debe de ser baja, aunque las diferentes enzimas difieren en este aspecto. Para la mayoría de ellas, la actividad catalítica se incrementa cuando aumenta la actividad del agua. Sin embargo, las lipasas están activas, aunque haya una baja actividad de agua, lo que permite que se pueda obtener un gran rendimiento en las reacciones de esterificación de lípidos. Sin embargo, la fosfolipasa pancreática A₂ requiere muy poca actividad del agua para poder realizar su función, lo que reduce el rendimiento comparado a las reacciones catalizadas por lipasas.

Por ejemplo, una manera propuesta para obtener un alto rendimiento en la reacción de esterificación en un tiempo razonable sería empezar la reacción con una alta actividad de agua para obtener la formación del producto en un periodo de tiempo corto. Una vez conseguido el equilibrio, la actividad del agua disminuiría para que se produjese la esterificación. Este procedimiento se repitió hasta que la actividad del agua se hizo demasiado baja para la enzima. De esta manera, se alcanzó un rendimiento cercano a la posición de equilibrio en la actividad de agua más baja a la que la enzima expresa actividad (Adlercreutz et al., 2001).

Cuando el método es llevado a cabo mediante transferasas, se pueden obtener altos rendimientos, aunque las constantes de equilibrio no sean muy favorables. Estas reacciones están bajo control cinético. La cinética para la transfosfatidilación catalizada por fosfolipasa D a menudo es muy favorable, lo que significa que se pueden obtener altos rendimientos incluso con una alta actividad de agua. De hecho, la mayoría de esas reacciones se llevan a cabo en sistemas de dos fases acuosas y orgánicas, lo que significa que la actividad del agua es cercana a 1,0 (Adlercreutz et al., 2001).

A estos elementos hay que añadirle la importancia de la selectividad por el sustrato de la enzima o la regioselectividad, definida como la tendencia de una enzima para actuar en una posición o dirección determinada de un tipo de enlace. Por ejemplo, en las reacciones en las que intervienen los intercambios de ácidos grasos, las lipasas y fosfolipasa A₂ son utilizadas para los intercambios de ácidos grasos, como ya se ha citado anteriormente, en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 (Adlercreutz *et al.*, 2001).

Por último, se puede producir la migración espontánea no deseada de los residuos de ácidos grasos, también llamada migración de grupos acilos. Esta ocurre si, durante la reacción, se involucran especies lipídicas con grupos hidroxilo adyacentes a los grupos acilo. Tanto el enfoque de hidrólisis-esterificación como el enfoque de transferasa involucran especies de lípidos en las que puede ocurrir la migración del acilo y, por lo tanto, es importante elegir las condiciones de reacción con cierta precisión y previo estudio, además de la utilización de grandes cantidades de enzimas (Adlercreutz *et al.*, 2001).

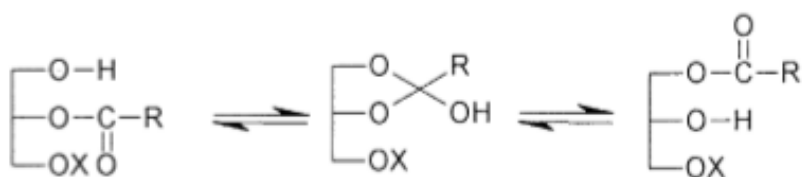


Figura 17: Migración de grupos acilos en lisoglicerofosfolípidos. Fuente: Adlercreutz *et al.*, 2001.

Además de la formación de productos secundarios con ácidos grasos en las posiciones no deseadas, la migración del acilo con frecuencia conduce a reducciones en el rendimiento total de lípidos polares enriquecidos con PUFA. La razón es que, cuando una enzima con regioselectividad ha eliminado un ácido graso del lípido, no puede eliminar el otro mientras permanezca en su posición original (Adlercreutz *et al.*, 2001). Akambi *et al.* (2013) consideran que un exceso de cantidad de lipasa y de tiempo de reacción pueden ser las principales causantes de la migración de grupos acilos durante el proceso de hidrólisis.

6.4 PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL ACEITE OBTENIDO

Una vez realizado el método de enriquecimiento y considerando el aceite el producto final que posee los lípidos polares enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados, algunos autores realizan un último paso de purificación y análisis por cromatografía. El paso de purificación se suele llevar a cabo mediante cromatografía de capa fina (TLC) o cromatografía en columna de gel de sílice (Guo *et al.*, 2005). Los resultados, por lo general, indican que la acción de las enzimas aumenta considerablemente la incorporación de PUFA de interés mediante el intercambio de los ácidos grasos existentes previamente en la molécula (Robles *et al.*, 2011).

Sin embargo, pese a los esfuerzos por buscar información sobre este punto en diferentes bases de datos, no se ha encontrado mayor información de cómo se ha podido llevar a cabo la purificación de lípidos polares enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados tras la rotura celular, la extracción y el enriquecimiento.

7. REFERENCIAS

- Adlercreutz, P., Lyberg, A., y Adlercreutz, D. (2003). Enzymatic fatty acid exchange in glycerophospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(10), 638–645. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300832>
- Adlercreutz, P., Virto, C., Persson, M., Vaz, S., Adlercreutz, D., Svensson, I., y Wehtje, E. (2001). Enzymatic conversions of polar lipids. Principles, problems and solutions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 173–178. [https://doi.org/10.1016/s1381-1177\(00\)00015-1](https://doi.org/10.1016/s1381-1177(00)00015-1)
- Akanbi, T. O., Adcock, J. L., y Barrow, C. J. (2013). Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity. *Food Chemistry*, 138(1), 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.007>
- Angles, E., Jaouen, P., Pruvost, J., y Marchal, L. (2017). Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. *Algal Research*, 21, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.005>
- Argüeso Armesto, R., Díaz Díaz, J. L., Díaz Peromingo, J. A., Rodríguez González, A., Castro Mao, M., y Diz-Lois, F. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicla Clin*, 72, 7–17.
- Arnold, A. A., Genard, B., Zito, F., Tremblay, R., Warschawski, D. E., y Marcotte, I. (2015). Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ¹³C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(1), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.017>
- Baeza-Jiménez, R., López-Martínez, L. X., Otero, C., Kim, I., y García, H. S. (2013). Enzyme-catalysed hydrolysis of phosphatidylcholine for the production of lysophosphatidylcholine. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*, 88(10), 1859–1863. <https://doi.org/10.1002/jctb.4040>
- Bang, H. O., Dyerberg, J., y Hjörne, N. (1976). The Composition of Food Consumed by Greenland Eskimos. *Acta Medica Scandinavica*, 200(1-6), 69–73. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1976.tb08198.x>
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., y Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1476–1493. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Bligh, E. G., y Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Chen, L., Li, R., Ren, X., y Liu, T. (2016). Improved aqueous extraction of microalgal lipid by combined enzymatic and thermal lysis from wet biomass of *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresource Technology*, 214, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.031>

- De Groot, R. H. M., Emmett, R., y Meyer, B. J. (2019). Non-dietary factors associated with n-3 long-chain PUFA levels in humans – a systematic literature review. *British Journal of Nutrition*, 121(7), 793–808. <https://doi.org/10.1017/s0007114519000138>
- Demuez, M., González-Fernández, C., y Ballesteros, M. (2015). Algicidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1615–1625. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.003>
- Devos, M., Poisson, L., Ergon, F., y Pencreac'h, G. (2006). Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.040>
- Dong, T., Knoshaug, E. P., Pienkos, P. T., y Laurens, L. M. (2016). Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, 177, 879–895. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.002>
- Molina Grima, E. M., González, M. J. I., y Giménez, A. G. (2012). Solvent Extraction for Microalgae Lipids. *Algae for Biofuels and Energy*, , 187–205. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_11
- Guo, Z., Vikbjerg, A. F., y Xu, X. (2005). Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances*, 23(3), 203–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.02.001>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., y Wijffels, R. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33(2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Halim, R., Danquah, M. K., y Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 709–732. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., y Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.136>
- He, Y., Li, J., Kodali, S., Chen, B., y Guo, Z. (2017). Rationale behind the near-ideal catalysis of *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) for highly concentrating ω -3 polyunsaturated fatty acids into monoacylglycerols. *Food Chemistry*, 219, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.149>
- Hino, A., Adachi, H., Toyomasu, K., Yoshida, N., Enomoto, M., Hiratsuka, A., . . . Imaizumi, T. (2004). Very long chain N-3 fatty acids intake and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 176(1), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.020>
- Hoyos Serrano, M., y Rosales Calle, V. V. (2014). Lípidos: características principales y su metabolismo. *Revista de Actualización Clínica* 41, 41, 2142–2145.
- Huang, W., y Kim, J. (2017). Simultaneous cell disruption and lipid extraction in a microalgal biomass using a nonpolar tertiary amine. *Bioresource Technology*, 232, 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.037>

- Jacob, J. P., y Mathew, S. (2016). Effect of Lipases from *Candida cylindracea* on Enrichment of PUFA in Marine Microalgae. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.12928>
- Kahveci, D., y Xu, X. (2011). Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, 129(4), 1552–1558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.142>
- Kim, D., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J., Lee, K., Park, J., . . . Oh, Y. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
- Leal Medina, G. I., Abril Bonett, J. E., Martínez Gélvez, S. J., Muñoz Peñaloza, Y. A., Peñaranda Lizarazo, E. M., y Urbina Suárez, N. A. (2017). Producción de Ácidos Grasos Poliinsaturados a partir de Biomasa Microalgal en un Cultivo Heterotrófico. *Revista Ion, Investigación, Optimización y Nuevos procesos en Ingeniería*, , 91–103. <https://doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017007>
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., y Oh, Y. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317–1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Mendes, R. L., Fernandes, H. L., Coelho, J., Reis, E. C., Cabral, J. M., Novais, J. M., y Palavra, A. F. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53(1), 99–103. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)95794-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)95794-7)
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H., Chong, W., Lam, M. K., Loh, P. K., y Vellayan, V. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180–197. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.150>
- Montero, Y., Gallo, A., Gómez, L., Álvarez, I., y Sabina, L. (2012). Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Investigación y Saberes*, 1, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.133>
- Mora-Gutierrez, A., Attaie, R., Núñez de González, M., Jung, Y., Woldesenbet, S., y Marquez, S. (2018). Complexes of lutein with bovine and caprine caseins and their impact on lutein chemical stability in emulsion systems: Effect of arabinogalactan. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 18–27. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13105>
- Naksuk, A., Sabatini, D. A., y Tongcumpou, C. (2009). Microemulsion-based palm kernel oil extraction using mixed surfactant solutions. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.03.008>
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2006). *Leghninger. Principios de Bioquímica*. Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Nguyen, Q. V., Malau-Aduli, B., Cavalieri, J., Malau-Aduli, A. E., y Nichols, P. (2019). Enhancing Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Content of Dairy-Derived Foods for Human Consumption. *Nutrients*, 11(4), 743. <https://doi.org/10.3390/nu11040743>

- Park, J., Park, M. S., Lee, Y., y Yang, J. (2015). Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass. *Bioresource Technology*, 184, 267–275.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.089>
- Parletta, N., Milte, C. M., y Meyer, B. J. (2013). Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(5), 725–743.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.01.002>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., y Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Plouguerné, E., Da Gama, B. A. P., Pereira, R. C., y Barreto-Bergter, E. (2014). Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00174>
- Robles, A., Jiménez, M. J., Esteban, L., González, P. A., Martín, L., Rodríguez, A., y Molina, E. (2011). Enzymatic production of human milk fat substitutes containing palmitic and docosahexaenoic acids at sn-2 position and oleic acid at sn-1,3 positions. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 1986–1992.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.022>
- Rodríguez, J. (2008). *Análisis de lípidos de biomembranas. Curso práctico..* Universidad Nacional de Rosario, Rosario: UNR Editora.
- Roux, J., Lamotte, H., y Achard, J. (2017). An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework. *Energy Procedia*, 112, 680–688.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.1137>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Muylaert, K., y Foubert, I. (2014). Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species. *Algal Research*, 3, 36–43.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.001>
- Salazar Pérez, L. E. (2012). *Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel*. Recuperado de
https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1490/ING_508.pdf?sequence=1
- Schuchardt, J. P., y Hahn, A. (2013). Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.03.010>
- Servaes, K., Maesen, M., Prandi, B., Sforza, S., y Elst, K. (2015). Polar Lipid Profile of *Nannochloropsis oculata* Determined Using a Variety of Lipid Extraction Procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3931–3941.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00241>
- Sforza, E., Bertucco, A., Morosinotto, T., y Giacometti, G. M. (2010). Vegetal oil from microalgae: species selection and optimization of growth parameters. *Chemical Engineering Transactions*, 20, 199–204. <https://doi.org/10.3303/CET1020034>

- Wang, J., Wang, X., Zhao, X., Liu, X., Dong, T., y Wu, F. (2015). From microalgae oil to produce novel structured triacylglycerols enriched with unsaturated fatty acids. *Bioresource Technology*, 184, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.133>
- Wen, Z., y Chen, F. (2000). Heterotrophic production of eicosapentaenoid acid by the diatom *Nitzschia laevis* : effects of silicate and glucose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 218–224. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000056>
- White, D., Rooks, P., Kimmance, S., Tait, K., Jones, M., Tarran, G., . . . Llewellyn, C. (2019). Modulation of Polar Lipid Profiles in *Chlorella* sp. in Response to Nutrient Limitation. *Metabolites*, 9(3), 39. <https://doi.org/10.3390/metabo9030039>
- Work, V. H., Bentley, F. K., Scholz, M. J., D'Adamo, S., Gu, H., Vogler, B. W., . . . Posewitz, M. C. (2013). Biocommodities from photosynthetic microorganisms. *Environmental Progress y Sustainable Energy*, 32(4), 989–1001. <https://doi.org/10.1002/ep.11849>
- Yao, L., Gerde, J. A., Lee, S., Wang, T., y Harrata, K. A. (2015). Microalgae Lipid Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1773–1787. <https://doi.org/10.1021/jf5050603>